

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 07133295

PUBLICATION DATE : 23-05-95

APPLICATION DATE : 27-08-93

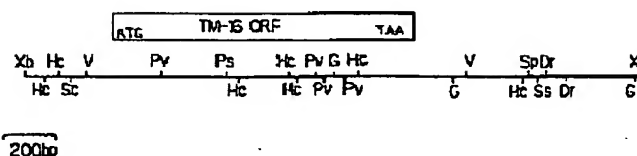
APPLICATION NUMBER : 05213102

APPLICANT : SHIONOGI &amp; CO LTD;

INVENTOR : TAKAHASHI KIYOTO;

INT.CL. : C07K 14/30 A61K 39/00 A61K 39/00  
 C12N 7/01 C12N 15/31 C12P 21/02  
 //(C12P 21/02 , C12R 1:92 )

TITLE : NEW ANTIGEN PROTEIN, ITS GENE,  
 RECOMBINANT BACULOVIRUS AND  
 ITS USE



ABSTRACT : PURPOSE: To obtain the subject new protein derived from Mycoplasma gallisepticum, usable as a component vaccine for preventing infection of birds with mycoplasma, by integrating a gene derived from Mycoplasma gallisepticum into baculovirus, manifesting.

CONSTITUTION: A new antigen protein is capable of being reacted with immune serum of Mycoplasma gallisepticum or infection serum of Mycoplasma gallisepticum, shows pure antigenicity, has a restriction enzyme cleavage map of the formula (ATG is initiation codon; TAA is termination codon; Xb is XbaI; Hc is HincIII; Sc is ScaI; V is EcoRV; Pv is PvuII; Ps is PstI; G is BglII; Sp is SpeI; Ss is SsrI; Dr is DraI), shows antigenicity of about 32 kilodalton molecular weight encoded by a DNA derived from Mycoplasma gallisepticum and is usable as a component vaccine for preventing infection of birds with mycoplasma, by integrating a gene derived from Mycoplasma gallisepticum into baculovirus, manifesting.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-133295

(43) 公開日 平成7年(1995)5月23日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/30		8318-4H		
A 6 1 K 39/00	J.			
	AFD A			
C 1 2 N 7/01				
15/31				

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-213102  
(22) 出願日 平成5年(1993)8月27日

(71) 出願人 000229117  
日本ゼオン株式会社  
東京都千代田区丸の内2丁目6番1号  
(71) 出願人 000001926  
塩野義製薬株式会社  
大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号  
(72) 発明者 森 肇  
京都府京都市北区小山下内河原町27-1  
(72) 発明者 斉藤 修治  
神奈川県川崎市中原区宮内480-1  
(72) 発明者 大川 節子  
神奈川県横浜市港北区篠原西町17-13  
(74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な抗原タンパク質、その遺伝子、及び組み換えバキュロウイルスとその利用

(57) 【要約】

【目的】 鳥類に感染するマイコプラズマ・ガリセプティカム用ワクチンの提供。

【構成】 マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原蛋白質の遺伝子をバキュロウイルスの非必須DNA領域に組み込んだ組み換えを生ワクチンとして使用するか又はウイルス同組み換えウイルスの産生する抗原タンパク質をコンポネントワクチンとして利用する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 マイコプラズマ・ガリセプティカム免疫血清またはマイコプラズマ・ガリセプティカム感染血清に反応しうる実質的に純粋な抗原タンパク質であって、図1に示される制限酵素切断点地図を有するマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の遺伝子がコードする分子量約32キロダルトンの抗原タンパク質、またはそれと同等の免疫性を示す限りにおいて修飾されていてもよい抗原タンパク質。

【請求項2】 請求項1記載の抗原タンパク質をコードする遺伝子。

【請求項3】 請求項1記載の抗原タンパク質を有効成分とするコンポネントワクチン。

【請求項4】 マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原タンパク質をコードする遺伝子を組み込んだ組み換えウイルス。

【請求項5】 用いるウイルスがアピボックスウイルスおよびバキュロウイルスから選ばれるウイルスである請求項4記載の組み換えウイルス。

【請求項6】 組み込む遺伝子が、分子量約40キロダルトンのマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原タンパク質をコードする遺伝子であって図4に示す制限酵素切断点地図を有する遺伝子および請求項2記載の遺伝子から選ばれる遺伝子である請求項4または5記載の組み換えウイルス。

【請求項7】 用いるウイルスがアピボックスウイルスである請求項4または6記載の組み換えウイルスを有効成分とした抗家禽マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症用組み換え生ワクチン。

【請求項8】 用いるウイルスがバキュロウイルスである請求項4または6記載の組み換えウイルスを用いることを特徴とするマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原タンパク質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原タンパク質、それをコードする遺伝子、該タンパク質を有効成分とするワクチン、およびマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原タンパク質をコードする遺伝子を組み込んだ組み換えウイルス、それを用いた組み換え生ワクチン、それを用いたマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原タンパク質の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 世界で最も重要な鶏などの家禽の感染症のひとつであるマイコプラズマ・ガリセプティカム (*Mycoplasma gallisepticum*) 感染症は、鶏においては、気嚢炎を伴う慢性の呼吸器障害を特徴とする疾病である。マイコプラズマ・ガリセプティカムに感染すると、産卵率並びに孵化率の低下が長期

に渡り引き起こされ、養鶏業界に重大な経済的損失をもたらす。また、マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症によって鶏の免疫能が低下して常圧菌や弱毒ワクチンなどの日和見感染も引き起こされる。これらの点から予想できる経済的被害は計り知れない額となる。いくつかのマイコプラズマ・ガリセプティカム抗原タンパク質が特開平2-111795号公報で開示されている。しかし、これらは天然のマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原タンパク質ではなく高い抗原性は期待できない。このため、より高い抗原性を有するタンパク質が求められている。また、前記公報など従来からマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原タンパク質を遺伝子工学的に製造する方法は、大腸菌や酵母を用いた系に限られていた（特開平2-111759号公報など）。このような系では、抗原発現量が少ない、発現したタンパク質の抗原性が低下・欠損するなどの原因があるほか、効果の高い生ワクチンとして利用できない、宿主由来の発熱性物質が取り除けないなどの問題があり、実用に適していなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは、かかる従来技術の中で、高い抗原性を示すマイコプラズマ由来の抗原タンパク質を得、また、新たなマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原タンパク質製造方法を開発すべく鋭意検討を進めた結果、新規なマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原タンパク質を見だし、さらにマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原タンパク質をコードする遺伝子を組み込んだ組み換えウイルスを見だし、本発明を完成するに至った。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明の新規な抗原タンパク質は、マイコプラズマ・ガリセプティカム免疫血清またはマイコプラズマ・ガリセプティカム感染血清と抗原抗体反応を呈し、マイコプラズマ・ガリセプティカムに由来する図1の制限酵素切断点地図を有するDNA配列がコードする抗原タンパク質、またはその修飾されたものである。このような抗原タンパク質の具体例として、32キロダルトンの分子量を有する図2または図3に示すときアミノ酸配列をもつ抗原タンパク質が例示される。また、ここでいう修飾された抗原タンパク質とは、上述の抗原タンパク質と同等の免疫原性を示す程度にアミノ酸配列が置換・脱落・欠損・挿入、付加されたものであるが、好ましくは図2または図3のアミノ酸配列を有する抗原タンパク質と同等の免疫原性を有し、かつ該タンパク質のアミノ酸配列との相同性が70%以上、より好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上のものである。本発明でいう相同性は、DNAシーケンス入力解析システム「DNASIS」（発売元：宝酒造（株））により測定されたものを指標とするものである。この抗原タンパク質は、常法にしたがって製造さ

れる。例えば、後述する組み換えバキュロウイルスを用いて製造することができる。

【0005】本発明の遺伝子は、前記抗原タンパク質をコードするものであり、具体例としては、図2または図3に示される塩基配列のものが挙げられるが、該配列中の塩基が置換・脱落・欠損・挿入、付加等によって修飾されたものであっても、修飾された遺伝子がコードするタンパク質の抗原タンパク質が本発明のタンパク質と実質的に同等の抗原性を示すかぎり使用できる。このような遺伝子の採取源としては、マイコプラズマ・ガリセプティカムに属するものであれば特に限定されないが、その具体例としてS6株(ATCC15302)、PG31(ATCC19610)などが例示される。

【0006】上記抗原タンパク質を有効成分とするコンポネントワクチンは、常法にしたがって調製され、希釈剤、増量剤、アジュバンドなどと混合してもよい。ワクチンは、体重1kg当り、抗原タンパク質量1 $\mu$ g以上の量で投与すればよく、上限は、急性毒性を示さない限り特に限定されず、例えば抗体が中和抗体価として1.0~2.0(10 $g_{10}$ )が得られる量を投与すればよい。急性毒性は、ニワトリに対し、体重1kg当たり抗原タンパク質量5mgの投与では認められない。本発明で得られた家禽用マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症ワクチンは、筋肉内、皮下または皮内注射等により、家禽に接種する。また、噴霧によって気道に免疫するか、あるいは通常の経口投与することも可能である。

【0007】本発明の組み換えウイルスは、マイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原タンパク質をコードする遺伝子を有するウイルスであればよく、使用されるウイルスは、通常遺伝子組み換え技術で用いるものであれば特に限定されないが、好ましくはアピボックスウイルス、ワクチニアウイルス、バキュロウイルス、であり、特に好ましくはアピボックスウイルスおよびバキュロウイルスである。

【0008】組み換えアピボックスウイルスに供されるウイルスとしては、アピボックスウイルスに分類される限りいかなる株でもよいが、鶏、七面鳥、アヒルなどの家禽類の細胞中で増殖可能なものが好ましく、その具体例として、ATCC VR-251, ATCC VR250, ATCC VR-229, ATCC VR-249, ATCC VR-288, 西が原株、酒水株、などのごときファウルボックスウイルスやファウルボックスウイルスと近縁のウイルスであって、NP株(鶏胎化場痘毒中野株)などのように鶏痘生ワクチン株として使用されるウイルスなどが例示される。これらの株はいずれも市販されており、容易に入手することができる。また、組み換えバキュロウイルスの作製に供されるウイルスとしては、昆虫細胞に感染するものであれば如何なるものでも良く、天然のものであっても、人工的に作製されたハイブリッドウイルスであっても良い。これらのウ

イルスの具体例として、オートグラファ・カリフォルニカ(*Autographa californica*)、トリコプルシア・ニ(*Trichoplusia ni*)、ラキプルシア・オウ(*Rachiplusia ou*)、ガレリア・メロネラ(*Galleria mellonella*)、ボンビックス・モリ(*Bombyx mori*)などの天然のバキュロウイルスや、オートグラファ・カリフォルニカとボンビックス・モリとから作製した、アルファルファワムシにもカイコにも感染する能力を有するハイブリッドウイルス(以下、AcNPV-BmNPVという;日本蚕糸学会第59回学術講演会講演要旨集、日本蚕糸学会編、第59頁、1989年、柴田ら、日本蚕糸学会第60回講演会講演要旨集、日本蚕糸学会、第78頁、1990年、Kondo, Maedaら、J. Virology、65、3625-3632(1991))のようなハイブリッドウイルスが例示される。なかでもAcNPV-BmNPVは、抗原タンパク質の製造に当たり、多種類の宿主を用いることができることから、とりわけ好ましい。

【0009】また、マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原タンパク質をコードする遺伝子としては、抗マイコプラズマ・ガリセプティカム血清と抗原抗体反応を呈する抗原タンパク質をコードするものであれば特に限定されず、後述する本発明の遺伝子のほか特開平2-111795号公報に開示された抗原タンパク質をコードする遺伝子またはその一部、あるいはマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の図4に示される制限酵素切断地図を有する40Kdのタンパク質をコードする遺伝子(図5及び図6)が挙げられる。図5および図6で示される塩基配列の第986番目~第988番目および第1048番目~1050番目の塩基は図中ではNNNである。これらの塩基は天然のマイコプラズマ・ガリセプティカムの遺伝子ではTGAであり、マイコプラズマ・ガリセプティカム内ではトリプトファンとして翻訳されていると予想される(J. Bacteriology、172(1)、504-506(1990))。しかし、通常はTGAは終止コドンであり、アミノ酸をコードするものではない。従って、目的とするタンパク質を発現させるためには、天然のマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の遺伝子のTGAをアミノ酸として翻訳されるような塩基に改変する必要がある。改変の手法は常法に従えばよく、本発明の実施例ではこれらの塩基を共にTGGに改変し、トリプトファンとして翻訳されるようにした。このような遺伝子の採取源も、前述と同様マイコプラズマ・ガリセプティカムに属するものであれば特に限定されないが、その具体例としてS6株(ATCC15302)、PG31(ATCC19610)などが例示される。また、上記抗原タンパク質をコードする遺伝子の5'上流に $\beta$ -ガラクトシダーゼをコードする遺伝子、 $\beta$ -ラクタマーゼをコードする遺伝子などの細菌由

来の酵素タンパク質をコードする遺伝子を適当なリンカーによって結合させた融合タンパク質遺伝子を用いれば、組み換えウイルスの構築に際し、組み換え体の選択などに便利である。

【0010】本発明の組み換えウイルスを構築する方法は、常法にしたがって行えばよく、例えば次の手順にしたがって行うことができる。まず、ウイルスの増殖に非必須なDNA領域（以下、単に非必須領域という）にプロモーターが挿入されたDNA断片を組み込んだ第一の組み換えベクターを作製する。次に前記プロモーターの下流に前述の抗原遺伝子を挿入して第二の組み換えベクターを作製する。第一および第二の組み換えベクターを作製するに当たっては、大腸菌の系を用いればよく、使用するベクターも目的に相応しいものであるかぎり、特に限定されない。ここで使用されるベクターの具体例としては、例えばpBR322、pBR325、pBR327、pBR328、pACYM1 (Virology, 173, 674-682 (1982))、pAC373 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8404-8408 (1985))、pUC7、pUC8、pUC9、pUC19などのプラスミド、 $\lambda$ -ファージ、M13ファージなどのごときファージ、pHC79などのごときコスミドが例示され、中でも、組み込むウイルスとしてアビボックスウイルスを使用するときは、例えば、pBR322、pBR325、pUC8、pUC9、pUC18などのプラスミド、 $\lambda$ -ファージ、M13ファージなどのファージ、pHC79などのコスミドなどのベクターが好適に使用される。バキュロウイルスを用いるときは、pACYM1やpAC373のようなバキュロウイルストランスファベクターとして確立されたプラスミドを用いることが好ましい。非必須領域とは、組み込むウイルスの増殖に非必須であり、かつ相同組み換えなどにより組み込むウイルスに挿入される領域であれば特に限定されず、アビボックスウイルスの増殖に非必須な領域としては、例えば、NP株DNAの約7.3 kbpのEcoRI断片、約5.2 kbpのHind III断片、約5.0 kbpのEcoRI-Hind III断片、約4.0 kbpのBamHI断片などと相同組み換えを起こす領域（特開平1-168279号）が例示される。バキュロウイルスの増殖に非必須な領域としては、ポリヘドリン遺伝子（サイエンス (Science)、219, 715-721 (1983)）などが例示される。

【0011】また、本発明で用いられるプロモーターとは、合成・天然を問わず遺伝子を組み込むウイルスが保有する転写の系でプロモーターとして有効に機能しうるものなら如何なる塩基配列のものでもよく、例えばアビボックスウイルス内で機能するものとしては、例えば、7.5 Kポリペプチドをコードするワクチニアウイルス遺伝子のプロモーター、11 Kポリペプチドをコードす

るワクチニアウイルス遺伝子のプロモーター、チミジンキナーゼをコードするワクチニアウイルス遺伝子のプロモーターなどが例示される他、プロモーターとして機能する限りにおいては、これらの一部を改変したものであっても、また、合成されたものであっても良い。このほか、初期プロモーターと後期プロモーターの両方の配列を有する合成プロモーター (A. J. Davidson et. al., J. Mol. Biol., 215, 749-769 and 771-784, 1989) やその一部をプロモーター活性が喪失しない範囲での削除、変更などにより改変されたもの（たとえばTTTTTTTTTTTGGCATATAAATAATAATAAATACAATAATTAATTACGCGTAAAAATTGAAAACTATTCTAATTTATTGCACTCで例示されるもの）をもちいると、組み換えアビボックスウイルスを接種した宿主が、効率よく抗体を産生し、好ましい。更に、バキュロウイルスのポリヘドリンをコードする遺伝子のプロモーター（以下、ポリヘドリンプロモーターという）や10 Kポリペプチドをコードするバキュロウイルス遺伝子のプロモーターなどが例示される。

【0012】最終的に組み換えウイルスを作製するには、第二の組み換えベクターをウイルスと混合した後、宿主として用いる培養細胞に移入し、あるいは第二の組み換えベクターを予めウイルスで感染させた宿主として用いる培養細胞に移入し、ベクターDNAとウイルスゲノムDNAの間に相同組み換えを起こさせ、組み換えウイルスを構築する。ここで宿主として用いる培養細胞とは、使用するウイルスが感染・増殖可能なものであれば特に限定されず、例えば、アビボックスウイルスを用いる場合、例えば鶏胎児繊維芽細胞（以下、CEFと称す）などの鶏胎児繊維芽細胞由来培養細胞が挙げられ、また、発育鶏卵しょう尿膜なども宿主の範疇に当然含まれる。また、バキュロウイルスを用いる場合には、通常、昆虫培養細胞が使用され、このような細胞の具体例としては、Sf9細胞やBmN細胞などが挙げられる。培養条件は、予備実験によって容易に決定できるが、具体的には、Sf9細胞を用いた場合は10%ウシ胎児血清を含む培地で、28℃で培養することが望ましい。このようにして構築された組み換えウイルスは、常法、例えばブランクアッセイなどによって純化される。

【0013】本発明の組み換え生ワクチンは、上記のようにして得られる組み換えアビボックスウイルスを有効成分とするものである。例えば、本発明の組み換えアビボックスウイルスが成育することのできる細胞を、本発明の組み換えアビボックスウイルスに感染させ、組み換えアビボックスウイルスが増殖するまで培養する。その後、細胞を回収し破碎する。この細胞破碎物を遠心分離機によって遠心分離チューブ中で沈澱物と組み換えアビボックスウイルスを含んだ非細胞依存性の高力価遠心血清とに分離する。実質的に宿主細胞を含まず、細胞培養

培地と組み換えウイルスを含んだこの遠心上清は、本発明のワクチンとして使用できる。また、薬理学的に受け入れられる生理食塩水等の様な物で再構成して使用する。遠心上清を凍結乾燥した凍結乾燥ワクチンとしても使用できる。

【0014】本発明の生ワクチンは、ワクチン中の組み換えアピボックスウイルスが家禽に感染して防御免疫反応を引き起こすような方法であれば、どのような方法で家禽に投与してもよい。例えば、皮膚に引っかき傷をつけてワクチンを接種したり、注射針やその他の器具等によって、家禽の皮下にワクチン接種することができる。また、ワクチンを家禽の飲み水に懸濁したり、飼料等の固形物に混入して、経口接種させることも可能である。さらに、エアロゾルやスプレーによるワクチンを吸入させる方法、静脈内接種法、筋肉内接種法、腹腔内接種法、翼膜接種法、発育卵接種法等を用いることもできる。

【0015】接種量は、例えば鶏の場合、1羽あたり、通常、 $10^2 \sim 10^7$  PFU（プラーク形成単位）である。注射する場合には、この量を生理食塩水などの生理学的に受け入れられる液体で希釈したりして0.01～1ml程度にすればよい。

【0016】本発明の抗原タンパク質の製造方法は、上述の方法によって作製され、純化された組み換えバキュロウイルスを宿主である昆虫または昆虫の樹立細胞に感染させ、感染虫を飼育または感染細胞を培養して抗原タンパク質を発現させることによって実現される。宿主として用いられる昆虫または昆虫の樹立細胞とは、通常、バキュロウイルスベクターの系で宿主として使用されるものであれば特に制限されるものではないが、例えば、昆虫としてヨウトウガ、カイコガ、アワヨウトウガ、セロクビア蚕、アルファルファワムシ（*Autographa californica*）、*Spodoptera exigua*、*Tricoplusia ni*等の幼虫、さなぎ、成虫等の虫体が、また、昆虫の樹立細胞としてSf細胞（例えばIPLB-Sf-21AE細胞、Sf9細胞等）、TN細胞およびBm細胞（例えば、BmN細胞、SES-BomO-15A細胞、ESE-BomO-15AII細胞、EISES-BomO-15AIIe細胞、NISES-BomO-CamI細胞等）が挙げられる。例えば、バキュロウイルスとしてAcNPV-BmNPVを用いた場合、Sf細胞やBm細胞、およびカイコやヨウトウガの虫体内（幼虫、成虫あるいはさなぎ）等の昆虫または昆虫の樹立細胞で増殖可能である。感染後の宿主の飼育または培養方法は、特に制限はなく、通常の方法が用いられる。即ち、昆虫を用いる場合であれば、虫体に本発明の組み換えバキュロウイルスを適当な溶媒に懸濁させ、それを注射して20～30℃で飼育する方法、昆虫の樹立細胞を用いる場合であれば、前記細胞へ適当な培地に懸濁した本発明の組

み換えバキュロウイルスを感染させ、20～30℃で培養する方法等が例示される。飼育または培養後、当業者によく知られているクロマトグラフィー、塩析による沈澱、密度勾配遠心等から任意に選択した方法により、目的とする抗原タンパク質が精製される。こうして得られた抗原タンパク質は、コンポネントワクチンとして用いることができる。勿論、精製せずに虫体や培養細胞に含まれた状態のタンパク質であっても本発明のコンポネントワクチンとして使用してもよい。

#### 【0017】

【発明の効果】かくして、本発明によればアピボックスウイルスの増殖に非必須なゲノム領域にマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原をコードするDNAがプロモーター機能を有するDNAと共に発現可能な形で組み込まれた組み換えアピボックスウイルスが得られ、このような組み換えアピボックスウイルスを生ワクチンとして鶏に接種することでマイコプラズマ・ガリセプティカム由来抗原に対する抗体を得ることができる。更に、本発明の組み換えバキュロウイルスを用いれば従来の技術に比較して効率よくマイコプラズマ・ガリセプティカム抗原タンパク質を製造することができる。また、本発明の新規な抗原タンパク質は、家禽マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症に対するワクチンとして有用であると共に、マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症診断薬としても有用である。

【0018】以下本発明を実施例および参考例により説明するが、本発明は勿論これらにより限定されるものではない。

【0019】【参考例-1】マイコプラズマ・ガリセプティカムが発現しているポリペプチド遺伝子T<sub>TM-1</sub>の取得

(1) マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノムDNAの調製

マイコプラズマ・ガリセプティカムS6株を100mlのPPLOブロス基礎培地に20%馬血清、5%酵母エキス、1%グルコース、およびpH指示薬としてフェノールレッドを微量加えて調製した液体培地で、37℃3～5日培養した。マイコプラズマ・ガリセプティカムの増殖に従って培養液のpHが下がり、培養液に含まれているpH指示薬の呈色が赤から黄に変化した時点で、培養を終了し、培養液を8000G、20分間遠心し、集菌した。さらに菌体を培養液の1/10容量のPBSに懸濁し、再び10,000rpm×G、20分間遠心し、集菌した。収集菌体を再び2.7mlのPBSに懸濁し、1%になる様にSDSを、さらに10μgのRNaseを加え、37℃30分間インキュベートし溶菌した。溶菌液を等容量のフェノールで3回抽出しさらに、エチルエーテルで3回抽出を行なった後エタノール沈澱し、マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノムDNA 200μgを得た。

【0020】(2) TTM-1遺伝子をプローブにしたマイコプラズマ・ガリセプティカム(Garlic)のゲノミックサザンハイブリダイゼーション

上記(1)で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカムDNA 1  $\mu$ gをXba Iで消化し、0.6%低融点アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルをアルカリ変性液(0.5M NaOH、1.5M NaCl)に10分間浸しDNAを変性させ、中和液(3M酢酸ナトリウムpH5.5)に10分間浸して中和の後6倍SSC液(0.7M NaCl、0.07Mクエン酸ナトリウム、pH7.5)中でナイロンメンブレンに転写した。風乾の後80℃で2時間焼き付け、4倍SET(0.6M NaCl、0.08M Tris-HCl、4mMEDTA、pH7.8)-10倍Denhardt-0.1% SDS-0.1%Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-50  $\mu$ g/ml変性サケ精子DNAとpUM-1(特開平2-11179.5号参照)を常法に従い標識したものを加えて、68℃14時間ハイブリダイゼーションをした。ナイロンメンブレンとX線フィルムを重ね、オートラジオグラフィで確認したところ、約3.4 kbpの断片にハイブリダイズしていることを確認した。

【0021】(3) Xba I消化約3.4 kbp断片のpUC-19へのクローニング及びコロニーハイブリダイゼーション

上記1-(1)で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカムDNA 4  $\mu$ gを制限酵素Xba Iで消化後、0.6%低融点アガロースゲル電気泳動後、約3.4 kbpの断片を回収した。この断片を、Xba I消化によって開裂したpUC-19とリガーゼによって連結し、コンピテントな大腸菌TG1株を形質転換し、5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド0.003%、イソプロピルチオ- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド0.03mM、40  $\mu$ g/mlアンピシリンを含むLB寒天培地で37℃、15時間培養した。この培地上に生育した白コロニーをナイロンメンブレンに転写し、上記(2)と同様の方法でハイブリダイゼーションを行ない、オートラジオグラフィで確認したところ、クローニングされていることが判明し、このプラスミドをpUTTM1と名付けた。

【0022】【参考例-2】

(1) TTM-1がコードするタンパクTTMG1を、TGAが翻訳終結コドンとして読まれないように改変(TGA→TGG)したTTM-1'の作製(図7参照)

参考例1-(3)のpUTTM-1を制限酵素Sac IとEcoRIで消化後0.8%低融点アガロースゲル電気泳動に供し、TTM-1の5'端を含む1.1 kbpの断片をフェノール・クロロホルム処理後エタノール沈澱により回収し、M13mp11ファージをSac IとEcoRIで開裂させた断片とリガーゼにより連結し

た。この反応溶液と、37℃で24時間培養した大腸菌TG1に最終的に100mMとなるようにIPTGを加えてX-galが2%となるようにさらに加えた溶液とm.o.i.が0.1になるよう混合し軟寒天上に撒いて固化させ、37℃、24時間インキュベートする。出現したファージブランクのうち青変していないファージからTTM-1の1.1 kbp DNAを含む組み換えファージTTM-1Nを得た。同様に、pUTTM-1をEcoRIとEcoRVで消化後、0.8%低融点アガロースゲル電気泳動に供し、TTM-1の3'末端側を含む0.4 kbpの断片をゲルより回収し、フェノール・クロロホルム処理後エタノール沈澱により回収し、M13mp11ファージをEcoRIとEcoRVで開裂させた断片とリガーゼにより連結した。この反応溶液を1.1 kbp DNAのクローニングと同様の方法で、TTM-1の0.4 kbp DNAを含む組み換えファージTTM-1Cを得た。

(2) 各組み換えファージから一本鎖DNAの調製  
上記(1)で得られた二種類の組み換えファージについて、100mlの2×YT培地で37℃で増殖している大腸菌TG1にm.o.i.=0.1になるようにそれぞれ加え、37℃で5時間振盪培養後5000gで30分遠心分離し、大腸菌菌体成分を除いた上清を取得する。この上清に0.2倍量のポリエチレングリコール/塩化ナトリウム混合溶液(20%ポリエチレングリコール#6000、2.5M NaCl)を加え4℃で1時間静置後5000gで20分遠心分離し、沈澱を回収する。この沈澱を500  $\mu$ lのTE緩衝液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH8.0)に溶かし、フェノール・クロロホルム抽出後、エタノール沈澱で各組み換えファージの単鎖DNAを回収した。

【0023】(3) 人工合成オリゴヌクレオチドをプライマーとする位置特異的変異体の作製

このようにして得られたDNAには、配列の途中にTGAがある。このTGAは、通常の細胞内では、終止コドンとして認識されてしまい、これより後ろに付加している配列を翻訳しなくなる。そこで、TGA部分をメチオニンとして翻訳するようにコドンNNNの第3番目の塩基に当たる塩基アデニンをグアニンに改変するために、次の2つのオリゴヌクレオチドを合成した。

【0024】

【化1】3'-TACGTTCTTCCTGGCAAA  
CCTTACCACTACTT-5'

【0025】

【化2】3'-CTACAAAGAACCTAAATA  
TCA-5'

【0026】化1のオリゴヌクレオチドはTTM-1Nの単鎖DNAと、化2のオリゴヌクレオチドはTTM-1Cの単鎖DNAとをアニールさせ、Frits Ecksteinらの方法(Nucleic Acid R





配列-12 5'-AGCTTTTTTTTTTTTTTTTGGCATATAAATAAATAACAATAATTACCGTAAAAATT  
 配列-13 3'-AAAAAAAAAAAAAACCCTATATTTATTATTATGTTATTAAATCCGCAATTTTAA  
 Hind III

【0032】最後に、pUTTM1Dを制限酵素Dra IとBam HIの消化回収断片1200bpと上記合成プロモーターとpUC18のHind III, BamHI開裂断片を連結し、pUTTM1Pを得た。

【0033】1-2 pNZ7929R1の構築  
 1-1によって得られたプラスミドpUTTM1Pを制限酵素Hind IIIとKpn Iで消化後、約1300bpの断片を回収する。次に、参考例3で得たFPV組み換え用ベクターpNZ1729R（特許出願平成4年第167478号）を制限酵素Hind IIIとKpn Iで開裂させた。この二つの断片を連結し、目的の組み換え用ベクターpNZ7929-R1を得た。

【0034】

【実施例-2】

組み換えFPV fNZ7929-R1の作製と純化

【0035】単層のCEFに鶏痘生ワクチン株であるNP株をm.o.i.=0.1で感染した。3時間後、これらの細胞をトリプシン処理で剥がし、細胞懸濁液とした。この懸濁液の $2 \times 10^7$ 個の細胞と10 $\mu$ gの組み換え用プラスミドpNZ7929-R1を混合し、Saline G (0.14M NaCl, 0.5mM KCl, 1.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5mM MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 0.011%グルコース)に懸濁し、室温においてジーンパルサー (Bio-Rad社)を用いて3.0kVcm<sup>-1</sup>, 0.4ms ec, 25℃の条件下でエレクトロポレーションした。プラスミドを導入した細胞を、その後37℃, 72時間培養し、3回の凍結融解によって細胞を溶解し、組み換えウイルスを含むウイルスを回収した。

【0036】回収した組み換えウイルスはつぎのようにして選択した。回収したウイルス液を単層のCEFに感染させ生育培地を含んだ10mlの寒天溶液を重層した。室温中で寒天を固めたのち、FPVのプラークが出現するまで37℃で培養後プルオギャル (Blue gal) を200 $\mu$ g/mlの濃度でふくんだ寒天培地を重層し、

CAAAAAGTATTCTAATTTATTCACCTCGTC -3'  
 CTTTTGATAAGATTAAATAACGTGACCAG -5'

さらに48時間37℃で培養した。前プラークのうち約1%のプラークが青く発色した。これらの青いプラークを単離・回収して、さらに同様の操作によって単離・回収を繰り返して、すべてのプラークがプルオギャルで青く染まるまでウイルスの純化を行った。通常この繰り返し操作は3~4回で終了する。この純化されたウイルスをfNZ7929-R1と名付けた。fNZ7929-R1はドットプロットハイブリダイゼーション、サザンブロットハイブリダイゼーションによってTTM-1, lacZ遺伝子ともに予想通りの位置にあることを確認した。

【0037】

【実施例-3】

fNZ7929-R1感染細胞におけるTTM-1ポリペプチドの発現

【0038】fNZ7929-R1がTTM-1ポリペプチドを感染細胞中で発現することを調べるために抗マイコプラズマ・ガリセプティカムS6株血清を用いた免疫蛍光抗体法を行った。fNZ7929-R1をCEFに感染させ、37℃でプラークが出現するまで培養後冷アセトンで固定し、マイコプラズマ・ガリセプティカムS6株で免疫した鶏血清（抗S6）またはマイコプラズマ・ガリセプティカムS6株感染鶏血清（感染S6）及びTTM-1ポリペプチド免疫鶏血清（抗TTM-1）を一次抗体として100~1000倍に希釈して反応させた。これらの培養細胞をさらに、蛍光物質 (FITC) を結合した抗鶏イムノグロブリンと反応させ、非特異反応部分を洗い流したのち蛍光励起波長光下で顕微鏡観察した。対照ウイルスとしてFPV-NP株, fNZ2337（特開平1-157381）を用い、対照一次抗体としてニューカッスル病ウイルス免疫鶏血清（抗NDV）とSPF鶏血清（SPF）を1000倍で用いた。反応性は表1に示した。

【0039】

【表1】

表1 組み換えウイルス感染CEFの各種血清に対する反応性

感染ウイルス	一次抗体に対する反応性				
	抗S6	感染S6	抗TTM-1	抗NDV	SPF
fNZ7929-R1	+	+	+	-	-
fNZ2337	-	-	-	+	-
NP	-	-	-	-	-

+: 反応する

-: 反応しない

【0040】fNZ7929-R1が感染した細胞は、抗S6および感染S6抗TTM-1とのみ反応し、その他の抗体とは反応しなかった。この事実は、fNZ7929-R1はTTM-1ポリペプチドを感染細胞中で発現していることを示している。

【0041】

【実施例-4】

fNZ7929-R1接種鶏への抗TTM-1ポリペプチド抗体誘導能

【0042】fNZ7929-R1をCEFで37℃、48時間培養後、二回凍結融解を繰り返し、細胞浮遊液を回収し、ウイルスタイターが $10^6$  pfu/mlとなるように調製したのち生後7日のSPF鶏 (Line M, 日本生物科学研究所) の右翼膜に穿刺用針で $10\mu$ l接種した。接種後善感発症を観察し、接種から2週後に血清を採取した。採取した血清の抗体価はELISA法で

測定した。精製したTTM-1ポリペプチドを $1\mu$ g/wellとなるようにバイカーボネートバッファーに溶解し、96wellマイクロタイタープレートに吸着させた後、スキムミルクでブロッキングを行ってその後の非特異的吸着を防いだ。次に各ウェルに被検血清の希釈液をのせたのちホースラディッシュペーパーオキシダーゼ結合抗鶏イムノグロブリン抗体 (ウサギ抗体) を二次抗体としてのせた。充分洗浄したのち、基質として2, 2'-アジノジエチルーベンズチアゾリンスルフォネートを加え、イムノリーダーで405nmの波長光に対する吸光度で抗体の相対希釈倍率を測定した (表2)。なお、対照一次抗体には、抗TTM-1ポリペプチド鶏血清を用いた。

【0043】

【表2】

表2 fNZ7929-R1接種鶏のTTM-1免疫鶏血清ポリペプチドに対する抗体価

接種ウイルス	抗TTM-1ポリペプチド抗体価 (希釈倍率) *
fNZ7929-R1	32
NP	1
	1
抗TTM-1	256

\* SPF鶏血清の反応性を1としたときの希釈倍率

【0044】この結果により、fNZ7929-R1は接種鶏に効果的に抗TTM-1抗体を誘導できる。このことからfNZ7929-R1は、鶏痘とマイコプラズマ・ガリセプティカム感染症に効果的に感染を防御するワクチンとして使用することができる。

【0045】

【実施例-5】

マイコプラズマ・ガリセプティカムが発現しているポリペプチド遺伝子TM-16の取得

(1) マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノムDNAの調製

マイコプラズマ・ガリセプティカムS6株を100mlのPPLOブロス基礎培地に20%馬血清、5%酵母エキス、1%グルコース、およびpH指示薬としてフェノールレッドを微量加えて調製した液体培地で、37℃3~5日培養した。マイコプラズマ・ガリセプティカムの増殖に従って培養液のpHが下がり、培養液に含まれているpH指示薬の呈色が赤から黄に変化した時点で、培養を終了し、培養液を8000G、20分間遠心し、集菌した。さらに菌体を培養液の1/10容量のPBSに

懸濁し、再び10,000rpm、20分間遠心し、集菌した。収集菌体を再び2.7mlのPBSに懸濁し、1%になる様にSDSを、さらに $10\mu$ gのRNaseを加え、37℃30分間インキュベートし溶菌した。溶菌液を等容量のフェノールで3回抽出しさらに、エチルエーテルで3回抽出を行なった後エタノール沈澱し、マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノムDNA200 $\mu$ gを得た。

【0046】(2) M-16遺伝子をプローブにしたマイコプラズマ・ガリセプティカムのゲノミックサザンハイブリダイゼーション

上記(1)で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカムDNA $1\mu$ gをXbaIで消化し、0.6%低融点アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルをアルカリ変性液 (0.5M NaOH、1.5M NaCl) に10分間浸しDNAを変性させ、中和液 (3M酢酸ナトリウムpH5.5) に10分間浸して中和の後6倍SSC液 (0.7M NaCl、0.07Mクエン酸ナトリウム、pH7.5) 中でナイロンメンブレンに転写した。風乾の後80℃で2時間焼き付け、4倍SET

(0.6M NaCl, 0.08M Tris-HCl, 4mMEDTA, pH7.8) - 10倍Denhardt - 0.1% SDS - 0.1% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> - 50μg/ml変性サケ精子DNAとpUM-16 (このプラスミド内にM-16遺伝子が含まれている; 特開平2-111795号参照) を常法に従い標識したものを加えて、68℃14時間ハイブリダイゼーションをした。ナイロンメンブレンとX線フィルムを重ね、オートラジオグラフィーで確認したところ、約5.5kbpの断片にハイブリダイズしていることを確認した。

【0047】(3) XbaI消化約5.5kbp断片のpUC-19へのクローニング及びコロニーハイブリダイゼーション

上記1-(1)で取得したマイコプラズマ・ガリセプテイカムDNA4μgを制限酵素XbaIで消化後、0.6%低融点アガロースゲル電気泳動後、約5.5kbpの断片を回収した。この断片を、XbaI消化によって開裂したpUC-19とリガーゼによって連結し、コンピテントな大腸菌TG1株を形質転換し、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド0.003%、イソプロピルチオ-β-D-ガラクトピラノシド0.03mM、40μg/mlアンピシリンを含むLB寒天培地で37℃、15時間培養した。この培地上に生育した白コロニーをナイロンメンブレンに転写し、上記(2)と同様の方法でハイブリダイゼーションを行ない、オートラジオグラフィーで確認したところ、クローニングされていることが判明し、このプラスミドをpUM16と名付けた。

【0048】(4) pUM-16インサートDNAの配列分析

実施例5(3)で作製したpUM-16内に挿入された約5.5kbpの断片の配列をSangerらのDideoxy法(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977))によって解析した。この断片の制限酵素切断点地図を図4に示す。また、この断片中に存在するオープンリーディングフレーム(以下ORFという)の制限酵素切断点地図を図1に示し、このORFの塩基配列及びそれから推定されるアミノ酸配列を図2および3に示す。このORFから推定されるポリペプチドをTM-16ポリペプチドと命名した。

【0049】

【実施例-6】

TM-16ポリペプチド発現リコンビナントウイルスの作製

(1) TM-16の開始コドン(ATG)直前及び終止コドン(TAA)直後への制限酵素サイト挿入YpMUTABの構築(図10参照)

pUM16を、EcoRIとPstIで消化後、0.8%低融点アガロースゲル電気泳動に供し、TM-16の

5'末端側を含む約1000bpの断片をゲルより回収し、フェノール、クロロホルム処理後、エタノール沈澱により回収した。次いで、この断片と、予めM13mp10ファージをEcoRIとPstIで開裂させて得た断片とをリガーゼにより連結した。この反応液を、37℃で24時間培養した大腸菌TG1に最終的に100mMとなるようにIPTG(イソプロピルチオ-β-D-ガラクトピラノシド)を加えてX-galが2%となるようにさらに加えた溶液と、m.o.i.が0.1になるように混合し、軟寒天上に撒いて固化させ、37℃、24時間インキュベートした。出現したファージブランクのうち、青変していない組み換えファージから、上記1000bp断片を含んでいるファージTM-16L'を得た。次に、単鎖DNA

5'-CTCAGTGGATCCAGAGATG-3'を合成し、TM-16L'から常法によって得た一本鎖ファージとアニールさせ、Frits Ecksteinらの方法(Nucleic Acid Research 8749-8764, 1985)によって目的の変異をおこさせて、得られた組み換えファージTM-16Lを、XbaI、NheIで切断し、約980bpの断片を0.8%アガロースゲル電気泳動によって回収し、エタノール沈澱で回収した。また、pUM-16をVspIで消化後、BamHIリンカーを常法に従い結合させ、約730bpの断片を回収した。この断片をpUC18をBamHIで切断した部位に組み込んでプラスミドpUM-16Rを得た。このプラスミドをXbaI、NheIで切断したベクター部を含む断片と、上記980bp断片をリガーゼによって結合させ、目的のプラスミドpMUTABを得た。

【0050】(2) TM-16遺伝子を含有するトランスファベクターpAcZM16の構築

(1)で得たpMUTABをBamHIで消化後0.8%アガロースゲル電気泳動し、ゲルより約1050bpの断片を回収した。一方バキュロウイルストランスファベクターpACYM1[Matsuura S. Virology, 173, 674-682 (1989)]をBamHIで開裂させ、さきほどの約1050bp断片と、リガーゼにより連結することにより、目的のトランスファベクターpAcZM16を得た。このベクターは、ポリヘドリン遺伝子内にポリヘドリンプロモーターの支配下となる様にTM-16遺伝子が挿入されたものを有している。

【0051】(3) 組み換えバキュロウイルスの作出  
F. L. グラハムらの論文(Virology 52巻 1973年 456-467頁)に記載されている方法に準じ、AcNPV-BmaNPVハイブリッドウイルスのゲノムDNA 1μgを上記(2)で得られたトランスファベクターpAcZM16 1~10μgと混合し、15μg/mlの仔牛胸腺DNAを含む、1-HE

PES (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸) 緩衝液 (pH 7.0) で950  $\mu$ lにした。混合物をスターラで攪拌しながら50mlの2.5M  $\text{CaCl}_2$ を滴下し、沈澱を室温で30分間形成させた。1mlの沈澱したDNAをSf細胞培養プレートに添加した。4時間後、細胞を培地で洗浄し、10%ウシ胎児血清を含む2mlの培地を加えて、3日間インキュベートした。その後、組み換え及び非組み換えウイルスが混じっている培地を集め、組み換えウイルスを単離するため、適当に希釈し、単層培養したSf細胞に感染させ、プラークを形成させた。核多角体を形成しないプラークを選び、そのプラークから組み換えバキュロウイルスを回収した。この組み換えバキュロウイルスをTM-16リコンビナントウイルスと命名した。

【0052】

【実施例-7】

3:カイコ虫体内での発現  
カイコ蛹(蛹になってから、25℃で2日間経過したもの)実施例6(3)で得られたTM-16リコンビナントウイルス( $5 \times 10^5$  PFU)を体節間膜から注射した。ウイルス接種後、蛹は25℃に保った。その後、感染された蛹虫体を摩砕し、その摩砕液に緩衝液を加え、SDS-PAGEを用いて検出した。なお、SDS-PAGEは、20mAの電流のもとで12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて、約2時間電気泳動を行い、得られたゲルをクーマシーブリリアントで染色して検出を行った。

【0053】

【実施例-8】

カイコ蛹で産生されたTM-16ポリペプチドの鶏における免疫効果

カイコ中で発現したTM-16ポリペプチドの有効性を確認するために実施例5により作製されたTM-16リコンビナントウイルス接種後4日目のカイコ幼虫10頭に13mlのリン酸緩衝食塩水(PBS)を加え、パーチスホモゲナイザーで粉砕し、 $\beta$ -プロピオラク톤を加えウイルスを不活化した。6,000rpm 30分間遠心した上清10mlにPBS 19ml、レオドルAO-15(セスキオレイン酸ソルビタン 花王株式会社製)4.5ml、レオドルTW-020(モノオレイン酸ポリオキシエチレン(20)ソルビタン 花王株式会社製)0.5ml、カーネーション(流動パラフィン Witco Corp. 社製)65mlおよび10%ホルマリン1.0mlを加え、オイルアジュバントワクチンを作製した。

【0054】このオイルアジュバントワクチンを49日齢のSPF白色レグホンに1.0mlずつ接種し、接種後、3週目に鶏から血清を採取し常法に従いELISAで抗TM-16抗体価を測定した(表3)。また、接種後6週目にマイコプラズマ・ガリセプティカムKP13株(Natl. Inst. Anim. Health. Q、4、68-(1964)、 $10^6$  c. f. uを鶏に点鼻攻撃した。攻撃後4日目に鶏を殺し、眼窩下洞を綿棒を用いてぬぐい取り、PTLO培地で168時間培養後、さらに同培地に継代して菌分離の有無で、感染防御効果を判定した(表4)。

【0055】

【表3】

表3. TM-16リコンビナントウイルス感染虫体免疫鶏のTM-16ポリペプチドに対する抗体価

抗 原	抗TM-16ポリペプチド抗体価*
TM-1リコンビナント感染虫体	47.2
親ウイルス感染虫体	1
カイコ虫体	1
非免疫	1

\* 非免疫鶏血清の反応性を1としたときの希釈倍率

【0056】

【表4】

表4. TM-16リコンビナントウイルス感染虫体免疫鶏の攻撃試験結果

抗 原	感染防御率*
TM-1リコンビナント感染虫体	0/6 (100%)
親ウイルス感染虫体	4/4 ( 0%)
カイコ虫体	4/4 ( 0%)
非免疫	3/3 ( 0%)

\*分母は攻撃羽数、分子は菌分離羽数、カッコ内は感染防御率

【0057】この結果により、TM-16リコンビナント感染虫体は抗TM-16ポリペプチド抗体を効果的に誘導するだけでなく、マイコプラズマ・ガリセプチカムの感染も防御し、マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症に有効なワクチンとして使用できる。

【0058】

【実施例-9】

TTM-1ポリペプチド発現リコンビナントウイルスの作製

(1) TTM-1遺伝子を含有するトランスファーベクターpAcZM-1の構築(図11参照)

実施例1-1で作製したプラスミドpUTTMIDを制限酵素SspIで開裂させた後、フェノール・クロロホルム処理し、エタノール沈殿により、開裂したpUTTMIDを回収した。この開裂したpUTTMIDをDNA-ポリメラーゼIでKlenow処理し、接着末端を平滑末端にして、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿によりDNAを回収した。次にBglIIで切断し、約1200bpのTTM-1 DNAを含む断片(①)を、0.8%アガロース電気泳動により回収した。一方、バキュロウイルストランスファーベクターpACYM1[Matsuura, S. Virology, 173 674-682 (1989)]を制限酵素BamHIで開裂させた後、フェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿により、開裂したpAcYM1を回収した。この開裂したpAcYM1をDNA-ポリメ

配列

AATTCGAGCT CGGATCGTTG AAAAAATAAT ATAGATCCTA AAATGGAA 48

【0062】

【配列表2】

配列番号: 2

配列の長さ: 48

配列

GATCTTCCAT TTTAGGATCT ATATTATTTT TTCAACGATC CGAGCTCG 48

【0063】

【配列表3】

配列番号: 3

配列の長さ: 55

配列

AGCTTTTTTT TTTTTTTTTT TTGGCATAT AAATAATAAA TACAATAATT AATTA 55

【0064】

【配列表4】

配列番号: 4

配列の長さ: 55

配列

CGCGTAATTA ATTATTGTAT TTATTATTTA TATGCCAAAA AAAAAAAAAA AAAAA 55

【0065】

【配列表5】

配列番号: 5

ーゼIでKlenow処理し接着末端を平滑末端にしてフェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿によりDNAを回収した。平滑末端になった開裂pAcYM1を制限酵素XhoIで切断し、約2100bpの断片(②)を、0.8%アガロース電気泳動により回収した。またpAcYM1をXhoI、BamHIで切断した後約7100bpの断片③も同様にして回収した。①②③の3断片を混合し、リガーゼによって連結し、目的のトランスファーベクターpAcZM-1を得た。

【0059】(2) TTM-1遺伝子を含むリコンビナントウイルス

実施例6(3)において、トランスファーベクターとしてpAcZM16のかわりにpAcZM-1を用いる以外同様の操作によって得られた組み換えバキュロウイルスをTTM-1リコンビナントと命名した。

【0060】以下に配列番号1から配列番号11の配列を示す。

【0061】

【配列表1】

配列番号: 1

配列の長さ: 48

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の長さ: 40

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGCGTAAAAA TTGAAAAACT ATTCTAATTT ATTGCACTCG 40

【0066】

配列の型：核酸

【配列表6】

鎖の数：1本鎖

配列番号：6

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：40

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATCCGAGTG CAATAAATTA GAATAGTTTT TCAATTTTAA 40

【0067】

配列の型：核酸

【配列表7】

鎖の数：1本鎖

配列番号：7

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：42

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATCCCCGGG CGAGCTCGCT AGCGGGCCCG CATGCGGTAC CG 42

【0068】

配列の型：核酸

【配列表8】

鎖の数：1本鎖

配列番号：8

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：42

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCGACGGATC CGCATGCGGG CCGCTAGCG AGCTCGCCCG GG 42

【0069】

配列の型：核酸

【配列表9】

鎖の数：1本鎖

配列番号：9

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：39

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCGACCCGGT ACATTTTAT AAAAATGTAC CCGGGGATC 39

【0070】

配列の型：核酸

【配列表10】

鎖の数：1本鎖

配列番号：10

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：35

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATCCCCGGG TACATTTTAA TAAAAATGTA CCGGG 35

【0071】

配列の型：核酸

【配列表11】

鎖の数：1本鎖

配列番号：11

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：14

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ATTTTATATAA AAAT 14

【図面の簡単な説明】

子を含むDNA配列及びアミノ酸配列の前半部。

【図1】 TM-16ポリペプチド全長をコードする遺伝子の制限酵素切断点地図。

【図6】 TTM-1ポリペプチド全長をコードする遺伝子を含むDNA配列及びアミノ酸配列の後半部。

【図2】 TM-16ポリペプチド全長をコードする遺伝子を含むDNA配列及びアミノ酸配列の前半部。

【図7】 TTM-1N及びTTM-1Cの作製方法。

【図3】 TM-16ポリペプチド全長をコードする遺伝子を含むDNA配列及びアミノ酸配列の後半部。

【図8】 pNZ7929-R1の作製方法。

【図4】 TTM-1ポリペプチド全長をコードする遺伝子の制限酵素切断点地図。

【図9】 TM-16ポリペプチドをコードする遺伝子近傍を含む遺伝子の制限酵素切断点地図。

【図5】 TTM-1ポリペプチド全長をコードする遺伝

【図10】 pMUTABの作製方法。

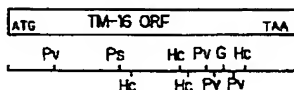
【図11】 pAcZM1の作製方法。

【图2】



【图 3】

【图9】

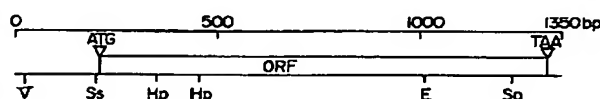


200bp

Xb:Xba I.Hc:Hinc II.Sc:Sca I.V:EcoR V.Pv:Pvu II  
Ps:Pst I.G:Bal II.Sp:Spe I.Dr:Drp I.H:Hind III

1	CGT	ACG	TTT	TAA	TGG	CTA	TTG	GCG	TCT	TAT	TTT	ATT	GTC	ACG	ATT	CCA	48	
49	CTA	ACA	GCA	GTT	ATA	GCA	AGC	CCA	ATT	AAC	TCA	GTA	GAA	GTT	ACA	GAG	95	
97	ATC	ATC	AAT	GCT	CAA	GAC	GTC	ACA	ACA	ACT	AAA	AAG	ATT	AGT	ACT	TTT	144	
1	M	M	N	G	C	Q	E	V	T	T	T	E	K	I	S	T	F	
145	GCC	TTT	TTC	ATC	AAC	ATG	TTA	CCA	AAT	TAC	CAA	CTA	ACT	ACA	GTT	GCT	192	
17	A	P	T	L	I	H	M	L	P	H	V	Q	L	S	T	L	G	
193	TAC	TAC	CAG	ATT	CTA	CCA	GCT	GCT	GCT	GGA	GTT	GTA	GCG	ATT	GTA	240		
83	TY	L	Q	I	T	A	A	A	A	G	G	L	V	V	G	I	V	
241	TTA	CTT	CCA	TTA	GCG	GCA	ACA	TTG	TTT	GTT	AAA	ACT	AGA	GCT	AAA	ACA	288	
49	L	L	A	L	C	A	T	F	F	V	S	T	R	R	E	T	64	
280	AAT	GAA	ATT	GTT	GTA	CCA	CTT	GAA	GAT	GCT	GAA	GAA	GAA	GAT	GTC	GCA	336	
65	H	B	M	L	A	C	A	Q	D	A	R	B	B	B	V	A	A	
337	CAA	GAA	GAA	CAA	GCT	GAA	GAA	AAT	GTT	GAA	GTC	ACT	CCA	ACT	CAA	CAA	384	
81	Q	E	E	Q	A	B	E	H	V	B	V	T	P	T	Q	Q	96	
385	GCT	GAA	GTT	AAG	ACT	GAA	CAA	TTA	ATT	GCG	ACA	CAA	TTA	CTA	A	ACT	432	
97	A	E	V	E	T	E	Q	L	I	G	T	C	Q	L	V	T	480	
433	GAT	GTA	GCT	AAC	AAT	CAA	GCT	GCA	GCT	ACT	CAA	CAA	GTT	GAA	GCT	GAT	480	
113	D	V	A	S	N	Q	A	A	G	T	E	Q	V	E	C	D	128	
481	TTA	TTA	GCT	CCT	AGT	CAA	CAA	CCA	ACG	GAA	ATG	GCT	CAA	GCT	CTA	528		
120	L	L	P	P	S	Q	Q	C	T	B	H	R	P	A	P	S	144	
520	CCA	ATG	GCT	AGT	CCT	AAG	TTA	TTC	GCT	CCA	AAC	CAA	GCT	GCT	CAT	CCA	576	
145	P	M	G	S	P	K	L	L	G	P	H	Q	A	G	H	P	160	
577	CAA	CAC	GGA	CCA	GCT	CCG	ATG	AAT	GCT	CAT	CCA	GCT	CAA	CCA	GCT	CCT	672	
101	Q	D	S	C	P	H	P	M	N	A	R	P	G	Q	P	B	P	
825	CAA	CAA	GCT	GCG	CCA	GST	CCA	ATG	GCA	GCT	GCT	GGA	TCT	AAC	CAA	CCA	672	
177	Q	Q	A	G	P	R	P	M	G	A	G	G	S	N	Q	P	192	
973	AGA	CCC	ATG	GCA	AAT	GCT	GCA	CAA	AAC	CAA	CAA	GCT	CCA	AGA	CCA	ATC	720	
103	R	P	M	P	N	G	P	Q	A	H	N	Q	G	C	P	R	M	
721	AAC	GCT	CAA	GCG	AAT	CCT	GCT	GCT	GCT	GGA	CCA	GCT	GCG	CCA	GGA	CCT	AAC	768
160	N	P	Q	G	N	P	R	P	R	G	P	A	G	P	E	P	N	816
769	GCT	CCA	CAA	AAT	TCT	CAA	GCT	GCT	CAA	CCA	GCT	GCG	CCA	GCT	GCT	CCA	824	
225	G	P	Q	N	S	Q	C	P	R	P	Q	P	A	G	C	P	R	240
817	ATG	GCA	GCT	GCT	AGA	TCT	AAC	CAA	CCA	AGA	CCA	ATG	CCA	AAT	GCT	CCA	884	
241	M	G	A	C	G	T	S	N	Q	R	P	M	P	N	E	C	E	255

【图4】



FOOB

Hp : HpaI  
Ss : SspI  
E : EcoRI  
Sp : SpeI  
V : EcoRV  
ATG : 翻訳開始コドン  
TAA : 翻訳終止コドン

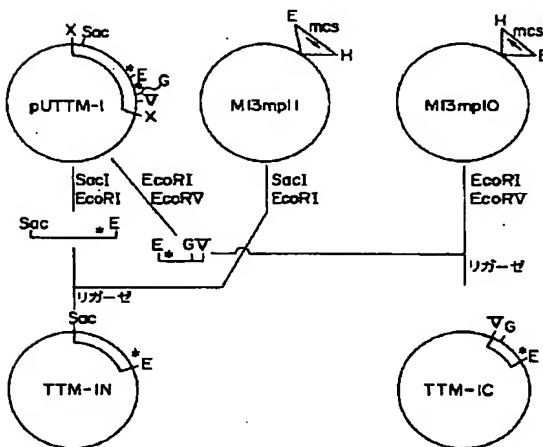
【図5】

1 AAA AAC ATC AGA TTG TTA ATC TGA TGT CTT TGC TTA AAA AAA GAC AAA  
49 ATC TTC TAA CAA AAT CCT AAA TAA ATA AOC COT TAA ATT AAC TAA AAA  
97 ATT AAA AAA ATG GTT TTT GTT ATC AAC CAA AAT TCT CTA GTA ATA AAC  
145 GCT TAT TTA TTT TTA TTT TTA GTC ATC TTT TAA GAT ATA AAT ATA TCT  
183 TAA TAT TCT ATG AAT AAG AAA ABA ATC ATC TTA AAG ACT ATT AGT TTA  
241 TTA GGT ACA ACA TGC TTT GTT AGC ATT GGG ATT TCT AGC TCT ATG TCT  
14 L G T Y S F L S I G I S S C M S  
289 ATT ACT AAA AAA GAC GCA AAC CCA AAT AAT GGC CAA ACC CAA TTA CAA  
30 I T K K O A N P N N B O T O L Q  
337 GCA GCG CGA ATG GAG TTA ACT GAT CTA ATC AAT GCT AAA GCA AGG ACA  
46 A A R M E L K M A K R T  
385 TTA GCT TCA CTA CAA GAC TAT GCT AAG ATT GAA GCT AGT TTA TCA TCT  
62 L A S L O D V A K I E A S L S S  
433 GCT TAT AAT GAA GCT GAA ACA GTT AAT AAT AAC CTT AAT GCA ACA CTA  
78 A Y S E A E T V N N L N A I N Q  
481 GAA CAA CTA AAA ATG GCT AAA ACT AAT TTA GAA TCA GGC ATC AAC CAA  
94 E O L K M A K R T  
529 GCT AAT ACG GAT AAA ACG ACT TTT GAT AAT GAA CAA CCA AAT TTA GTT  
110 A N T D K T T F D N E H P N L V  
577 GAA GCA TAC AAA GCA CTA AAA ACC ACT TTA GAA CAA GGT GCT ACT AAC  
126 E A Y K A L K T T L E G R A T N  
625 CTT GAA GGT TTA GCT TCA ACT GCT TAT AAT GAG ATT GAT AAT TTA  
142 L E S L A S T A Y N O I R N N L  
673 GTG GAT CTA TAC AAT AAT GCT AAT AAT TTA ATA ACT AAA ACA CTA GAT  
156 V D L Y N H A S S L I T K T L D

【図6】

721 CCA CTA AAT GCG GCA ATG CTT TTA GAT TCT AAT GAG ATT ACT ACA GTT  
176 P L N G G M L L D S N E I T T V  
769 AAT GCG AAT ATT AAT AAT ACG TTA TCA ACT ATT AAT GAA CAA AAG ACT  
190 N R N I N N T L S T I N E Q K T  
817 AAT GCT GAT GCA TTA TCT AAT AGT TTT ATT AAA AAA GTG ATT CAA AAT  
206 N A D A L S N S F I K K V I O N  
865 AAT GAA CAA AAT TTT GTA GGG ACT TTT ACA AAC GCT AAT GTT CAA COT  
222 N E O S F V S T F T N A N V O P  
913 TCA AAC TAC AAT TTT GTT GCT TTT AAT GCT GAT GTA ACA CCC GTC AAT  
236 S N Y S F V A F S A D V T P V N  
961 TAT AAA TAT GCA AGA AGG ACC GTT TGG AAT GGT GAT GAA COT TCA AGT  
254 Y K Y A R R T V W N G C E P S S  
1009 AGA ATT CTT GCA AAC ACG AAT AGT ATC ACA GAT GTT TCT TGG ATT TAT  
270 R I L A N T N S I T D V S W I Y  
1057 AGT TTA GCT GCA ACA AAC ACG AAG TAC CAA TTT AGT TTT AGC AAC TAT  
286 S L A G T R T K Y O F S F S N Y  
1105 GGT GCA TCA ACT GGT TAT TTA TAT TTC COT TAT AAG TTA GTT AAA GCA  
302 G P S T O Y L V F P Y K L V K A  
1153 GCT GAT GCT AAT AAC GTT GCA TTA CAA TAC AAA TTA AAT AAT GGA AAT  
318 A D A N H N V G L O Y K L N N G O N  
1201 GTT CAA CAA GTT GAG TTT GCG ACT TCA ACT AAT GCA AAT AAT ACT ACA  
334 V O O V E F A T S T S A N N T T  
1249 GCT AAT GCA ACT CAG CAG TTG ATG AGA TTA AAG TTG CTA AAA TCG TTT  
350 A N P T O O L M R L K L L K S F  
1297 TAT CAG GTT TAA GAT TTG GCG AAA ACA CAA TCG AAT TAA GTG TTC CAA  
366 Y O V \*  
1345 CCG GTG AAG GAA ATA TGA ATA AAG TTG CCG CAA TGA TTG GCA A → BglE 1387

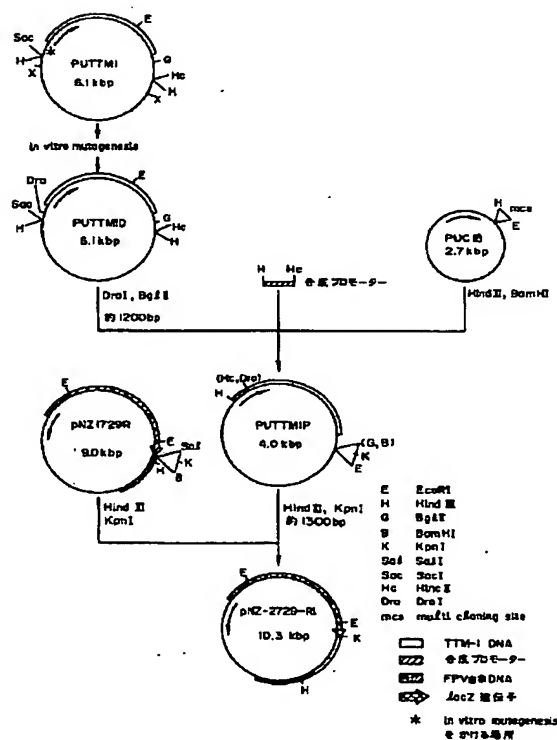
【図7】



E : EcoRI  
V : EcoRV  
G : BglII  
Sac : SacI  
X : XbaI  
Ss : SspI  
Sp : SpeI

\* 変異をかけるヌクレオチドの位置

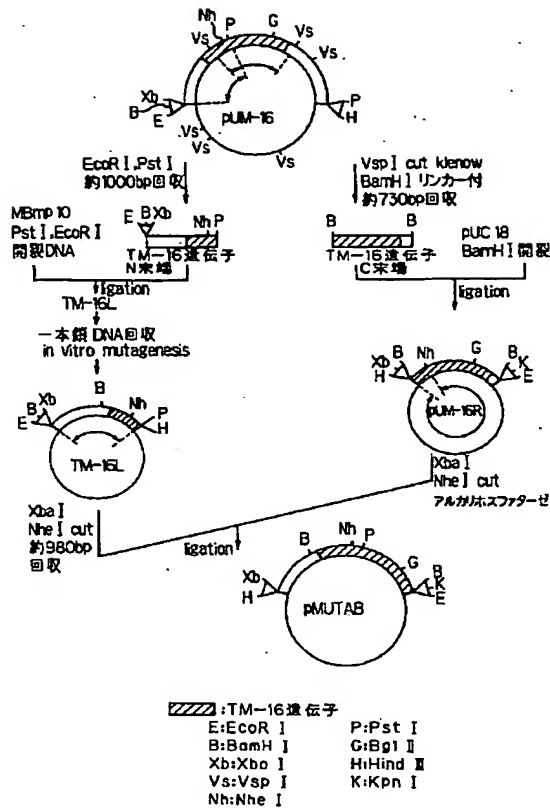
【図8】



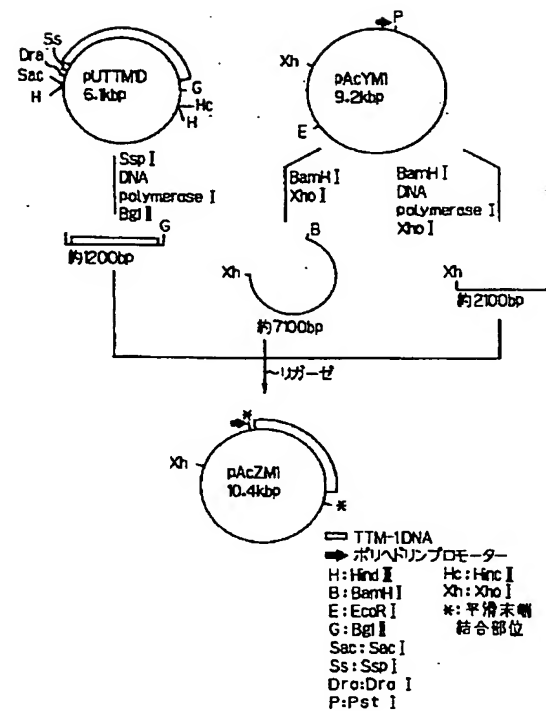
E : EcoRI  
H : HindII  
G : BglII  
V : EcoRV  
K : KpnI  
B : BamHI  
D : DnaI  
S : SacI  
Mc : HindIII  
Dr : DnaI  
mca : mcaII cloning site  
□ : TTM-1 DNA  
▨ : 合成 DNA  
▧ : PPV DNA  
▩ : LacZ 遺伝子  
\* : in vitro mutagenesis  
○ : 変異の位置



【図10】



【図11】



【手続補正書】

【提出日】平成6年6月1日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】新規な抗原タンパク質、その遺伝子、及び組み換えバキュロウイルスとその利用

【特許請求の範囲】

【請求項1】 マイコプラズマ・ガリセプティカム免疫血清またはマイコプラズマ・ガリセプティカム感染血清に反応しうる実質的に純粋な抗原性を示すポリペプチドであって、図1に示される制限酵素切断点地図を有するマイコプラズマ・ガリセプティカム由来のDNAがコードする分子量約32キログルトンの抗原性を示すポリペプチド、またはそれと同等の免疫性を示す限りにおいて修飾されていてもよい抗原性を示すポリペプチド。

【請求項2】 請求項1記載の抗原性を示すポリペプチ

ドをコードする遺伝子。

【請求項3】 請求項1記載の抗原性を示すポリペプチドを有効成分とするコンポネントワクチン。

【請求項4】 マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチドをコードする遺伝子を組み込んだ組み換えバキュロウイルス。

【請求項5】 組み込む遺伝子が、分子量約40キログルトンのマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチドをコードする遺伝子であって図2に示す制限酵素切断点地図を有するDNAおよび請求項2記載のDNAから選ばれるDNAである請求項4記載の組み換えウイルス。

【請求項6】 請求項4または5記載の組み換えウイルスを用いることを特徴とするマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規なマイコプラズマ・ガリセプティカムに対して抗原性を示すポリペプチ

ド、それをコードするDNA、該ポリペプチドを有効成分とするワクチン、およびマイコプラズマ・ガリセプティカムに対して抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組み換えウイルス、それを用いた組み換え生ワクチン、それを用いたマイコプラズマ・ガリセプティカムに対して抗原性を示すポリペプチドの製造方法に関する。

#### 【0002】

【従来の技術】世界で最も重要な鶏などの家禽の感染症のひとつであるマイコプラズマ・ガリセプティカム (*Mycoplasma gallisepticum*) 感染症は、鶏においては、気嚢炎を伴う慢性の呼吸器障害を特徴とする疾病である。マイコプラズマ・ガリセプティカムに感染すると、産卵率並びに孵化率の低下が長期に渡り引き起こされ、養鶏業界に重大な経済的損失をもたらす。また、マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症によって鶏の免疫能が低下して常圧菌や弱毒ワクチンなどの日和見感染も引き起こされる。これらの点から予想できる経済的被害は計り知れない額となる。いくつかのマイコプラズマ・ガリセプティカム抗原タンパク質が特開平2-111795号公報で開示されている。しかし、これらは天然のマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原タンパク質ではなく高い抗原性は期待できない。このため、より高い抗原性を有するタンパク質が求められている。また、前記公報など従来からマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原タンパク質を遺伝子工学的に製造する方法は、大腸菌や酵母を用いた系に限られていた(特開平2-111759号公報など)。このような系では、抗原発現量が少ない、発現したタンパク質の抗原性が低下・欠損するなどの原因があるほか、効果の高い生ワクチンとして利用できない、宿主由来の発熱性物質が取り除けないなどの問題があり、実用に適していなかった。

#### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、かかる従来技術の中で、高い抗原性を示すマイコプラズマ由来の抗原性を示すポリペプチドを得、また、新たなマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原性を示すポリペプチド製造方法を開発すべく鋭意検討を進めた結果、新規なマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原性を示すポリペプチドを見だし、さらにマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組み換えウイルスを見だし、本発明を完成するに至った。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明の新規な抗原性を示すポリペプチドは、マイコプラズマ・ガリセプティカム免疫血清またはマイコプラズマ・ガリセプティカム感染血清と抗原抗体反応を呈し、マイコプラズマ・ガリセプティカムに由来する図1の制限酵素切断点地図を有す

るDNA配列がコードする抗原性を示すポリペプチド、またはその修飾されたものである。このような抗原性を示すポリペプチドの具体例として、32キログルトンの分子量を有する配列1(配列番号1)に示すときアミノ酸配列をもつ抗原性を示すポリペプチドが例示される。また、ここでいう修飾された抗原性を示すポリペプチドとは、上述の抗原性を示すポリペプチドと同等の免疫原性を示す程度にアミノ酸配列が置換・脱落・欠損・挿入、付加されたものであるが、好ましくは配列1(配列番号1)のアミノ酸配列を有する抗原タンパク質と同等の免疫原性を有し、かつ該タンパク質のアミノ酸配列との相同性が70%以上、より好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上のものである。本発明でいう相同性は、DNAシーケンス入力解析システム「DNASSIS」(発売元:宝酒造(株))により測定されたものを指標とするものである。この抗原タンパク質は、常法にしたがって製造される。例えば、後述する組み換えバキュロウイルスを用いて製造することができる。

【0005】本発明のDNAは、前記抗原性を示すポリペプチドをコードするものであり、具体例としては、配列1(配列番号1)に示される塩基配列即ち、TM-16ポリペプチドをコードするDNA、のものが挙げられるが、該配列中の塩基が置換・脱落・欠損・挿入、付加等によって修飾されたものであっても、修飾された遺伝子がコードする抗原性を示すポリペプチドが本発明のポリペプチドと実質的に同等の抗原性を示すかぎり使用できる。

【0006】また、マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAとしては、抗マイコプラズマ・ガリセプティカム血清と抗原抗体反応を呈する抗原性を示すポリペプチドをコードするものであれば特に限定されず、後述する本発明の遺伝子のほか特開平2-111795号公報に開示された抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAまたはその一部、あるいはマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の図2に示される制限酵素切断地図を有する40KdのポリペプチドをコードするDNA配列13(配列番号13)が挙げられる。配列13(配列番号13)で示される塩基配列の第986番目～第988番目および第1048番目～第1050番目の塩基は配列中ではNNNである。これらの塩基は天然のマイコプラズマ・ガリセプティカムの遺伝子ではTGAであり、マイコプラズマ・ガリセプティカム内ではトリプトファンとして翻訳されていると予想される(J. Bacteriology, 172(1), 504-506(1990))。しかし、通常はTGAは終止コドンであり、アミノ酸をコードするものではない。従って、目的とするポリペプチドを発現させるためには、天然のマイコプラズマ・ガリセプティカム由来のDNAのTGAをアミノ酸として翻訳されるような塩基に改変する必要がある。改変の手法は常法

に従えばよく、本発明の実施例ではこれらの塩基を共にTGGに改変し、トリプトファンとして翻訳されるようにした。このようなDNAの採取源も、前述と同様マイコプラズマ・ガリセプティカムに属するものであれば特に限定されないが、その具体例としてS6株(ATCC 15302)、PG31(ATCC 19610)などが例示される。また、上記抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAの5'上流にβ-ガラクトシダーゼをコードするDNA、β-ラクタマーゼをコードするDNAなどの細菌由来の酵素タンパク質をコードするDNAを適当なリンカーによって結合させた融合ポリペプチドDNAを用いれば、組み換えウイルスの構築に際し、組み換え体の選択などに便利である。

【0007】上記抗原タンパク質を有効成分とするコンボネントワクチンは、常法にしたがって調製され、希釈剤、増量剤、アジュバンドなどと混合してもよい。ワクチンは、体重1kg当り、抗原タンパク質量1μg以上の量で投与すればよく、上限は、急性毒性を示さない限り特に限定されず、例えば抗体が中和抗体価として1.0~2.0(log<sub>10</sub>)が得られる量を投与すればよい。急性毒性は、ニワトリに対し、体重1kg当たり抗原タンパク質量5mgの投与では認められない。本発明で得られた家禽用マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症ワクチンは、筋肉内、皮下または皮内注射等により、家禽に接種する。また、噴霧によって気道に免疫するか、あるいは通常の経口投与することも可能である。

【0008】本発明の組み換えバキュロウイルスは、マイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAを有するバキュロウイルスであればよい。

【0009】組み換えバキュロウイルスの作製に供されるウイルスとしては、昆虫細胞に感染するものであれば如何なるものでも良く、天然のものであっても、人工的に作製されたハイブリッドウイルスであっても良い。これらのウイルスの具体例として、オートグラファ・カリフォルニカ(Autographa californica)、トリコプルシア・ニ(Trichoplusia ni)、ラキプルシア・オウ(Rachiplusia ou)、ガレリア・メロネラ(Galleria mellonella)、ボンビックス・モリ(Bombyx mori)などの天然のバキュロウイルスや、オートグラファ・カリフォルニカとボンビックス・モリとから作製した、アルファルファワムシにもカイコにも感染する能力を有するハイブリッドウイルス(以下、AcNPV-BmNPVという；日本蚕糸学会第59回学術講演会講演要旨集、日本蚕糸学会編、第59頁、1989年、柴田ら、日本蚕糸学会第60回講演会講演要旨集、日本蚕糸学会、第78頁、1990年、Kondo、Maedara、J. Virology、65、3625-3632(1991))のようなハイブ

リッドウイルスが例示される。なかでもAcNPV-BmNPVは、抗原タンパク質の製造に当たり、多種類の宿主を用いることができることから、とりわけ好ましい。

【0010】本発明の組み換えウイルスを構築する方法は、常法にしたがって行えばよく、例えば次の手順にしたがって行うことができる。まず、ウイルスの増殖に非必須なDNA領域(以下、単に非必須領域という)にプロモーターが挿入されたDNA断片を組み込んだ第一の組み換えベクターを作製する。次に前記プロモーターの下流に前述の抗原遺伝子を挿入して第二の組み換えベクターを作製する。第一および第二の組み換えベクターを作製するに当たっては、大腸菌の系を用いればよく、使用するベクターも目的に相応しいものであるかぎり、特に限定されない。ここで使用されるベクターの具体例としては、例えばpBR322、pBR325、pBR327、pBR328、pAcYM1(Virology、173、674-682(1982))、pAc373(Proc. Natl. Acad. Sci. US A、82、8404-8408(1985))、pUC7、pUC8、pUC9、pUC18、pUC19などのプラスミド、λ-ファージ、M13ファージなどのごときファージ、pHC79などのごときコスミドが例示され、pAcYM1やpAc373のようなバキュロウイルストランスファーベクターとして確立されたプラスミドを用いることが好ましい。非必須領域とは、組み込むウイルスの増殖に非必須であり、かつ相同組み換えなどにより組み込むウイルスに挿入される領域であれば特に限定されず、バキュロウイルスの増殖に非必須な領域としては、ポリヘドリンDNA(サイエンス(Science)、219、715-721(1983))などが例示される。

【0011】また、本発明で用いられるプロモーターとは、合成・天然を問わずDNAを組み込むウイルスが保有する転写の系でプロモーターとして有効に機能しうるものなら如何なる塩基配列のものでもよく、バキュロウイルスのポリヘドリンをコードする遺伝子のプロモーター(以下、ポリヘドリンプロモーターという)や10KポリペプチドをコードするバキュロウイルスDNAのプロモーターなどが例示される。

【0012】最終的に組み換えウイルスを作製するには、第二の組み換えベクターをウイルスと混合した後、宿主として用いる培養細胞に移入し、あるいは第二の組み換えベクターを予めウイルスで感染させた宿主として用いる培養細胞に移入し、ベクターDNAとウイルスゲノムDNAの間に相同組み換えを起こさせ、組み換えウイルスを構築する。ここで宿主として用いる培養細胞とは、使用するウイルスが感染・増殖可能なものであれば特に限定されず、バキュロウイルスを用いる場合には、通常、昆虫培養細胞が使用され、このような細胞の具体

例としては、Sf9細胞やBmN細胞などが挙げられる。培養条件は、予備実験によって容易に決定できるが、具体的には、Sf9細胞を用いた場合は10%ウシ胎児血清を含む培地で、28℃で培養することが望ましい。このようにして構築された組み換えウイルスは、常法、例えばブランクアッセイなどによって純化される。

【0013】本発明の組み換え生ワクチンは、上記のようにして得られる組み換えウイルスを有効成分とするものである。例えば、本発明の組み換えウイルスが成育することのできる細胞を、本発明の組み換えウイルスに感染させ、組み換えウイルスが増殖するまで培養する。その後、細胞を回収し破碎する。この細胞破碎物を遠心分離機によって遠心分離チューブ中で沈澱物と組み換えウイルスを含んだ非細胞依存性の高力価遠心上清とに分離する。実質的に宿主細胞を含まず、細胞培養培地と組み換えウイルスを含んだこの遠心上清は、本発明のワクチンとして使用できる。また、薬理学的に受け入れられる生理食塩水等の様な物で再構成して使用する。遠心上清を凍結乾燥した凍結乾燥ワクチンとしても使用できる。

【0014】本発明の生ワクチンは、ワクチン中の組み換えウイルスが家禽に感染して防御免疫反応を引き起こすような方法であれば、どのような方法で家禽に投与してもよい。例えば、皮膚に引っかき傷をつけてワクチンを接種したり、注射針やその他の器具等によって、家禽の皮下にワクチン接種することができる。また、ワクチンを家禽の飲み水に懸濁したり、飼料等の固形物に混入して、経口接種させることも可能である。さらに、エアロゾルやスプレーによるワクチンを吸入させる方法、静脈内接種法、筋肉内接種法、腹腔内接種法、翼膜接種法、発育卵接種法等を用いることもできる。

【0015】接種量は、例えば鶏の場合、1羽あたり、通常、 $10^2 \sim 10^7$  PFU（ブランク形成単位）である。注射する場合には、この量を生理食塩水などの生理学的に受け入れられる液体で希釈したりして0.01～1ml程度にすればよい。

【0016】本発明の抗原性を示すポリペプチドの製造方法は、上述の方法によって作製され、純化された組み換えバキュロウイルスを宿主である昆虫または昆虫の樹立細胞に感染させ、感染虫を飼育または感染細胞を培養して抗原性を示すポリペプチドを発現させることによって実現される。宿主として用いられる昆虫または昆虫の樹立細胞とは、通常、バキュロウイルスベクターの系で宿主として使用されるものであれば特に制限されるものではないが、例えば、昆虫としてヨウトウガ、カイコガ、アワヨウトウガ、セロクピア蚕、アルファルファワムシ（*Autographa californica*）、*Spodoptera exigua*、*Tricoplusia ni*等の幼虫、さなぎ、成虫等の虫体が、また、昆虫の樹立細胞としてSf細胞（例えばIPLB-Sf-21AE細胞、Sf9細胞等）、TN細胞

およびBm細胞（例えば、BmN細胞、SES-BOMo-15A細胞、ESE-BOMo-15AII細胞、EISES-BOMo-15AIIe細胞、NISES-BOMo-CamI細胞等）が挙げられる。例えば、バキュロウイルスとしてAcNPV-BmNPVを用いた場合、Sf細胞やBm細胞、およびカイコやヨウトウガの虫体内（幼虫、成虫あるいはさなぎ）等の昆虫または昆虫の樹立細胞で増殖可能である。感染後の宿主の飼育または培養方法は、特に制限はなく、通常の方法が用いられる。即ち、昆虫を用いる場合であれば、虫体に本発明の組み換えバキュロウイルスを適当な溶媒に懸濁させ、それを注射して20～30℃で飼育する方法、昆虫の樹立細胞を用いる場合であれば、前記細胞へ適当な培地に懸濁した本発明の組み換えバキュロウイルスを感染させ、20～30℃で培養する方法等が例示される。飼育または培養後、当業者によく知られているクロマトグラフィー、塩析による沈澱、密度勾配遠心等から任意に選択した方法により、目的とする抗原タンパク質が精製される。こうして得られた抗原性を示すポリペプチドは、コンポネントワクチンとして用いることができる。勿論、精製せずに虫体や培養細胞に含まれた状態のポリペプチドであっても本発明のコンポネントワクチンとして使用してもよい。

#### 【0017】

【発明の効果】本発明の組み換えバキュロウイルスを用いれば従来の技術に比較して効率よくマイコプラズマ・ガリセプティカムに抗原性を示すポリペプチドを製造することができる。また、本発明の新規な抗原性を示すポリペプチドは、家禽マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症に対するワクチンとして有用であると共に、マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症診断薬としても有用である。

【0018】以下本発明を実施例および参考例により説明するが、本発明は勿論これらにより限定されるものではない。

#### 【0019】〔参考例-1〕

マイコプラズマ・ガリセプティカムが発現しているポリペプチドDNATTM-1の取得

(1) マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノムDNAの調製

マイコプラズマ・ガリセプティカムS6株を100mlのPPL0ブロス基礎培地に20%馬血清、5%酵母エキス、1%グルコース、およびpH指示薬としてフェノールレッドを微量加えて調製した液体培地で、37℃3～5日培養した。マイコプラズマ・ガリセプティカムの増殖に従って培養液のpHが下がり、培養液に含まれているpH指示薬の呈色が赤から黄に変化した時点で、培養を終了し、培養液を8000G、20分間遠心し、集菌した。さらに菌体を培養液の1/10容量のPBSに懸濁し、再び10,000rpm×G、20分間遠心

し、集菌した。収集菌体を再び2.7 mlのPBSに懸濁し、1%になる様にSDSを、さらに10  $\mu$ gのRNaseを加え、37℃30分間インキュベートし溶菌した。溶菌液を等容量のフェノールで3回抽出しさらに、エチルエーテルで3回抽出を行なった後エタノール沈澱し、マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノムDNA 200  $\mu$ gを得た。

【0020】(2) TTM-1 DNAをプローブにしたマイコプラズマ・ガリセプティカムのゲノミックサザンハイブリダイゼーション

上記(1)で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカムDNA 1  $\mu$ gをXba Iで消化し、0.6%低融点アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルをアルカリ変性液(0.5M NaOH、1.5M NaCl)に10分間浸しDNAを変性させ、中和液(3M酢酸ナトリウムpH5.5)に10分間浸して中和の後6倍SSC液(0.7M NaCl、0.07Mクエン酸ナトリウム、pH7.5)中でナイロンメンブレンに転写した。風乾の後80℃で2時間焼き付け、4倍SET(0.6M NaCl、0.08M Tris-HCl、4mMEDTA、pH7.8)-10倍Denhardt-0.1% SDS-0.1%Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-50  $\mu$ g/ml変性サケ精子DNAとpUM-1(特開平2-111795号参照)を常法に従い標識したものを加えて、68℃14時間ハイブリダイゼーションをした。ナイロンメンブレンとX線フィルムを重ね、オートラジオグラフィーで確認したところ、約3.4 kbpの断片にハイブリダイズしていることを確認した。

【0021】(3) Xba I消化約3.4 kbp断片のpUC-19へのクローニング及びコロニーハイブリダイゼーション

(1)で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカムDNA 4  $\mu$ gを制限酵素Xba Iで消化後、0.6%低融点アガロースゲル電気泳動後、約3.4 kbpの断片を回収した。この断片を、Xba I消化によって開裂したpUC-19とリガーゼによって連結し、コンピテントな大腸菌TG1株を形質転換し、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド0.003%、イソプロピルチオ- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド0.03mM、40  $\mu$ g/mlアンピシリンを含むLB寒地培地で37℃、15時間培養した。この培地上に生育した白コロニーをナイロンメンブレンに転写し、上記(2)と同様の方法でハイブリダイゼーションを行ない、オートラジオグラフィーで確認したところ、クローニングされていることが判明し、このプラスミドをpUTTM-1と名付けた。

【0022】【参考例-2】

(1) TTM-1がコードするポリペプチドTTMG1を、TGAが翻訳終結コドンとして読まれないように改変(TGA→TGG)したTTM-1'の作製(図3

参照)

上記1-(3)のpUTTM-1を制限酵素Sac IとEcoRIで消化後0.8%低融点アガロースゲル電気泳動に供し、TTM-1の5'端を含む1.1 kbpのDNA断片をフェノール・クロロホルム処理後エタノール沈澱により回収し、この断片とM13mp11ファージをSac IとEcoRIで開裂させた断片とをリガーゼにより連結した。この反応溶液と、37℃で24時間培養した大腸菌TG1に最終的に100mMとなるようにIPTGを加えてX-galが2%となるようにさらに加えた溶液とm.o.i.が0.1になるよう混合し軟寒地上に撒いて固化させ、37℃、24時間インキュベートする。出現したファージブランクのうち青変していないファージからTTM-1の1.1 kbp DNAを含む組み換えファージTTM-1Nを得た。同様に、pUTTM-1をEcoRIとEcoRVで消化後、0.8%低融点アガロースゲル電気泳動に供し、TTM-1の3'末端側を含む0.4 kbpの断片をゲルより回収し、フェノール・クロロホルム処理後エタノール沈澱により回収し、この断片をM13mp10ファージをEcoRIとEcoRVで開裂させた断片とリガーゼにより連結した。この反応溶液から1.1 kbp DNAのクローニングと同様の方法で、TTM-1の0.4 kbp DNAを含む組み換えファージTTM-1Cを得た。

(2) 各組み換えファージから一本鎖DNAの調製

上記(1)で得られた二種類の組み換えファージについて、100 mlの2×YT培地で37℃で増殖している大腸菌TG1にm.o.i.=0.1になるようにそれぞれ加え、37℃で5時間振盪培養後5000Gで30分遠心分離し、大腸菌菌体成分を除いた上清を取得する。この上清に0.2倍量のポリエチレングリコール/塩化ナトリウム混合溶液(20%ポリエチレングリコール#6000、2.5M NaCl)を加え4℃で1時間静置後5000Gで20分遠心分離し、沈澱を回収する。この沈澱を500  $\mu$ lのTE緩衝液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH8.0)に溶かし、フェノール・クロロホルム抽出後、エタノール沈澱で各組み換えファージの単鎖DNAを回収した。

【0023】(3) 人工合成オリゴヌクレオチドをプライマーとする位置特異的変異体の作製

このようにして得られたDNAには、配列の途中にTGAがある。このTGAは、通常の細胞内では、終止コドンとして認識されてしまい、これより後ろに付加している配列を翻訳しなくなる。そこで、TGA部分をメチオニンとして翻訳するようにコドンNNNの第3番目の塩基に当たる塩基アデニンをグアニンに改変するために、次の2つのオリゴヌクレオチドを合成した。

【0024】

【化1】

- 5'

【化2】

NP株のEcoRI断片(約7.3 kbp)をpUC18のEcoRI切断部位(マルチクローニング部位の末端)に組み込んでプラスミドpNZ133(約10.0 kbp)を得た。このプラスミドから、HpaI-SpeI断片(約3.0 kbp)のNP株由来断片を切り出し、該断片をクレノー(Klenow)断片により平滑末端とした。またpUC18からRcoRI-HindIII断片(52 bpのマルチクローニング部位)を除き、残りの断片をクレノー断片で平滑末端とした。かくして得られたこの2つの断片をつないで、プラスミドとし、HpaI-SpeI断片中のEcoRV部位を除いて、そこにpUC18のEcoRI-HindIII断片(52 bpのマルチクローニング部位)をHindIIIリンカー(5'-CAAGCTTG-3')とEcoRIリンカー(5'-GGAATTCC-3')を用

上記参考例1-(1)で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカムDNA 1  $\mu$ gをXba Iで消化し、0.6%低融点アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルをアルカリ変性液(0.5M NaOH、1.5M NaCl)に10分間浸しDNAを変性させ、中和液(3M酢酸ナトリウム pH 5.5)に10分間浸して中和の後6倍SSC液(0.7M NaCl、0.07Mクエン酸ナトリウム、pH 7.5)中でナイロンメンブレンに転写した。風乾の後80℃で2時間焼き付け、4倍SET(0.6M NaCl、0.08M Tris-HCl、4mMEDTA、pH 7.8)-10倍Denhardt-0.1% SDS-0.1% Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-50  $\mu$ g/ml 変性サケ精子DNAとpUM-16(このプラスミド内にM-16 DNAが含まれている。

特開平2-111795号参照)を常法に従い標識したものを加えて、68℃14時間ハイブリダイゼーションをした。ナイロンメンブレンとX線フィルムを重ね、オートラジオグラフィーで確認したところ、約5.5 kbpの断片にハイブリダイズしていることを確認した。

【0031】(2) XbaI消化約5.5 kbp断片のpUC-19へのクローニング及びコロニーハイブリダイゼーション

上記参考例1-(1)で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカムDNA 4 µgを制限酵素XbaIで消化後、0.6%低融点アガロースゲル電気泳動後、約5.5 kbpの断片を回収した。この断片を、XbaI消化によって開裂したpUC-19とリガーゼによって連結し、コンピテントな大腸菌TG1株を形質転換し、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド0.003%、イソプロピルチオ-β-D-ガラクトピラノシド0.03 mM、40 µg/mlアンピシリンを含むLB寒天培地で37℃、15時間培養した。この培地上に生育した白コロニーをナイロンメンブレンに転写し、上記(2)と同様の方法でハイブリダイゼーションを行ない、オートラジオグラフィーで確認したところ、クローニングされていることが判明し、このプラスミドをpUM-16と名付けた。

【0032】(3) pUM-16インサートDNAの配列分析

上記(2)で作製したpUM-16内に挿入された約5.5 kbpの断片の配列をSangerらのDideoxy法(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463 (1977))によって解析した。この断片の制限酵素切断点地図を図2に示す。また、この断片中に存在するオープンリーディングフレーム(以下ORFという)の制限酵素切断点地図を図4に示し、このORFの塩基配列及びそれから推定されるアミノ酸配列を配列1(配列番号1)に示す。このORFから推定されるポリペプチドをTM-16ポリペプチドと命名した。

【0033】

【実施例-2】

TM-16ポリペプチド発現リコンビナントウイルスの作製

(1) TM-16の開始コドン(ATG)直前及び終止コドン(TAA)直後への制限酵素サイト挿入したプラスミドpMUTABの構築(図5参照)

pUM-16を、EcoRIとPstIで消化後、0.8%低融点アガロースゲル電気泳動に供し、TM-16の5'末端側を含む約1000 bpの断片をゲルより回収し、これをフェノール、クロロホルム処理した後、エタノール沈澱により再回収した。次いで、この断片と、予めM13mp10ファージをEcoRIとPstIで開裂させて得た断片とをリガーゼにより連結した。この

反応液を、37℃で24時間培養した大腸菌TG1に最終的に100 mMとなるようにIPTG(イソプロピルチオ-β-D-ガラクトピラノシド)を加えてX-galが2%となるようにさらに加えた溶液と、m.o.i.が0.1になるように混合し、軟寒天上に撒いて固

化させ、37℃、24時間インキュベートした。出現したファージブランクのうち、育変していない組み換えファージから、上記1000 bp断片を含んでいるファージTM-16L'を得た。次に、単鎖DNA

5'-CTCAGTGGATCCAGAGATG-3'を合成し、TM-16L'から常法によって得た一本鎖ファージとアニールさせ、Frits Ecksteinらの方法(Nucleic Acid Research 8749-8764, 1985)によって目的の変異をおこさせて、得られた組み換えファージTM-16Lを、XbaI、NheIで切断し、約980 bpの断片を0.8%アガロースゲル電気泳動によって回収し、エタノール沈澱で回収した。また、pUM-16をVspIで消化後、BamHIリンカーを常法に従い結合させ、約730 bpの断片を回収した。この断片をpUC18をBamHIで切断した部位に組み込んでプラスミドpUM-16Rを得た。このプラスミドとXbaI、NheIで切断したベクター部を含む断片と、上記980 bp断片の三断片をリガーゼによって結合させ、目的のプラスミドpMUTABを得た。

【0034】(2) TM-16 DNAを含有するトランスファーベクターpAcZM16の構築

(1)で得たpMUTABをBamHIで消化後0.8%アガロースゲル電気泳動し、ゲルより約1050 bpの断片を回収した。一方バキュロウイルストランスファーベクターpACYM1[Matsuura S. Virology, 173, 674-682 (1989)]をBamHIで開裂させ、得られた断片をさきほどの約1050 bp断片と、リガーゼにより連結することにより、目的のトランスファーベクターpAcZM16を得た。このベクターには、ポリヘドリンDNA内にポリヘドリンプロモーターの支配下となる様にTM-16 DNAが挿入されているものである。

【0035】(3) 組み換えバキュロウイルスの作出  
F. L. グラハムらの論文(Virology 52巻1973年 456-467頁)に記載されている方法に準じ、AcNPV-BmNPVハイブリッドウイルスのゲノムDNA 1 µgを上記(2)で得られたトランスファーベクターpAcZM16 1~10 µgと混合し、15 µg/mlの仔牛胸腺DNAを含む、1-HEPES(N-2-ヒドロキシエチルピペラジーン-N'-2-エタンスルホン酸)緩衝液(pH 7.0)で950 µlにした。混合物をスターラで攪拌しながら50 mlの2.5M CaCl<sub>2</sub>を滴下し、沈澱を室温で30分間形成させた。1 mlの沈澱したDNAをSf細胞培



養プレートに添加した。4時間後、細胞を培地で洗浄し、10%ウシ胎児血清を含む2mlの培地を加えて、3日間インキュベートした。その後、組み換え及び非組み換えウイルスが混じっている培地を集め、組み換えウイルスを単離するため、適当に希釈し、単層培養したSf細胞に感染させ、プラークを形成させた。核多角体を形成しないプラークを選び、そのプラークから組み換えバキュロウイルスを回収した。この組み換えバキュロウイルスをTM-16リコンビナントウイルスと命名した。

#### 【0036】

##### 【実施例-3】

##### 3: カイコ虫体内での発現

カイコ蛹（蛹になってから、25℃で2日間経過したもの）実施例2（3）で得られたTM-16リコンビナントウイルス（ $5 \times 10^5$  PFU）を体節間膜から注射した。ウイルス接種後、蛹は25℃に保った。その後、感染された蛹虫体を摩砕し、その摩砕液に緩衝液を加え、SDS-PAGEを用いて検出した。なお、SDS-PAGEは、20mAの電流のもとで12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて、約2時間電気泳動を行い、得られたゲルをクーマシーブリリアントブルーで染色して検出を行った。

#### 【0037】

##### 【実施例-4】

カイコ蛹で産生されたTM-16ポリペプチドの鶏における免疫効果

カイコ中で発現したTM-16ポリペプチドの有効性を

確認するために実施例1により作製されたTM-16リコンビナントウイルス接種後4日目のカイコ幼虫10頭に13mlのリン酸緩衝食塩水（PBS）を加え、パーチスホモグナイザーで粉碎し、 $\beta$ -プロピオラク톤を加えウイルスを不活化した。6,000rpm30分間遠心した上清10mlにPBS19ml、レオドールAO-15（セスキオレイン酸ソルビタン 花王株式会社製）4.5ml、レオドールTW-020（モノオレイン酸ポリオキシエチレン（20）ソルビタン 花王株式会社製）0.5ml、カーネーション（流動パラフィン Witco Corp. 社製）65mlおよび10%ホルマリン1.0mlを加え、オイルアジュバントワクチンを作製した。

【0038】このオイルアジュバントワクチンを49日齢のSPF白色レグホンに1.0mlずつ接種し、接種後、3週目に鶏から血清を採取し常法に従いELISAで抗TM-16抗体価を測定した（表1）。また、接種後6週目にマイコプラズマ・ガリセプチカムKP13株（Natl. Inst. Anim. Health. Q、4、68-（1964））、 $10^6$  c. f. uを鶏に点鼻攻撃した。攻撃後4日目に鶏をと殺し、眼窩下洞を綿棒を用いてぬぐい取り、PTLO培地で168時間培養後、さらに同培地に継代して菌分離の有無で、感染防御効果を判定した（表2）。

#### 【0039】

##### 【表1】

表1. TM-16リコンビナントウイルス感染虫体免疫鶏のTM-16ポリペプチドに対する抗体価

抗 原	抗TM-16ポリペプチド抗体価*
TM-16リコンビナント感染虫体	47.2
親ウイルス感染虫体	1
カイコ虫体	1
非免疫	1

#### 【0040】

##### 【表2】

\* 非免疫鶏血清の反応性を1としたときの希釈倍率



表2. TTM-16リコンビナントウイルス感染虫体免疫鶏の攻撃試験結果

抗 原	感染防御率*
TTM-16リコンビナント感染虫体	0/6 (100%)
親ウイルス感染虫体	4/4 ( 0%)
カイコ虫体	4/4 ( 0%)
非免疫	3/3 ( 0%)

【0041】この結果により、TTM-16リコンビナントウイルス分子は感染防御率100%を示し、ホルム処理、エタノール沈殿によりDNAを回収した。次にBglIIで切断し、約1200bpのTTM-1 DNAを含む断片(①)を、0.8%アガロース電気泳動により回収した。一方、バキュロウイルス・トランスファーベクターpACYM1 [Matsuura, S. Virology, 173: 674-682 (1989)]を制限酵素BamHIで開裂させた後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿により、開裂したpACYM1を回収した。この開裂したpACYM1をDNA-ポリメラーゼIでKlenow処理し、接着末端を平滑末端にしてフェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿によりDNAを回収した。平滑末端になった開裂pACYM1を制限酵素XhoIで切断し、約2100bpの断片(②)を、0.8%アガロース電気泳動により回収した。またpACYM1をXhoI、BamHIで切断した後約7100bpの断片③も同様に回収した。①②③の3断片を混合し、リガーゼによって連結し、目的のトランスファーベクターpAcZM-1を得た。

【0042】

【実施例-4】

TTM-1ポリペプチド発現リコンビナントウイルスの作製

(1) 1-1 合成プロモーターとTTM-1 DNAを結合したプラスミドpUTTM1Dの構築  
参考例2で得たTTM-1 DNA全長を含むプラスミドpUTTM1' (WO 93/24646公報参照)のうちTTM-1ポリペプチドの開始コドンにあたるATGの上流に制限酵素DraI切断部位をつくるために、まず次のオリゴヌクレオチドを合成した。

3'-TATAGAAATTAAATTTTACTTATTC-5'

つぎに、pUTTM-1'を制限酵素SacIとEcoRIで消化後約2300bpの断片を回収し、これをM13mp10のSacIとEcoRIで開裂させた断片と連結し、単鎖組み換えファージTTM-1'を得た。上記オリゴヌクレオチドと単鎖TTM-1'とをアニールさせ、Frits Ecksteinらの方法(Nucleic Acid Research 8749-8764, 1985)によって目的の変異をおこさせた。この変異組み換えファージDNAを制限酵素SacIとEcoRIで消化後約2300bpの断片を回収し、再びpUTTM-1'をSacIとEcoRIで消化したベクターを含んだ断片にクローニングし、pUTTM1Dを得た。

(2) TTM-1 DNAを含有するトランスファーベクターpAcZM-1の構築 (図6参照)

(1)で作製したプラスミドpUTTM1Dを制限酵素SspIで開裂させた後、フェノール・クロロホルム処理し、エタノール沈殿により、開裂したpUTTM1Dを回収した。この開裂したpUTTM1DをDNA-ポリメラーゼIでKlenow処理し、接着末端を平滑末

【0043】(3) TTM-1 DNAを含むリコンビナントウイルス

実施例2(3)において、トランスファーベクターとしてpAcZM16のかわりにpAcZM-1を用いる以外同様の操作によって得られた組み換えバキュロウイルスをTTM-1リコンビナントと命名した。以下に配列番号1から配列番号13の配列を示す。尚、配列番号2から配列番号12まではいずれも相補配列なので3'-末端から表記している。

【配列1】

配列番号: 1

配列の長さ: 1945

配列の型: 核酸

鎖の数: 2本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: DNA

配列

1	CGT	ACC	TTT	TAA	TGG	CTA	TTG	GGC	TCT	TAT	TTT	ATT	CTC	ACG	ATT	GCA	48
48	CTA	ACA	GCA	GTT	ATA	GCA	AGC	CCA	ATT	AAC	TCA	GTA	CAA	GTT	ACA	GAG	96
97	ATG	ATG	AAT	GCT	CAA	GAA	GTC	ACA	ACA	ACT	AAA	AAG	ATT	ACT	ACG	TTT	144
1	M	M	N	G	Q	E	Y	T	T	T	K	X	I	S	T	F	192
145	GCC	TTC	TTA	ATC	AAC	ATG	TTA	CCA	AAT	TAC	CAA	CTA	AGT	ACA	CTT	GCT	192
17	A	P	L	I	H	N	L	P	N	Y	Q	L	S	T	L	G	32
193	TAC	TTA	CAG	ATT	ACA	GCA	GCT	GCT	GCT	GCA	CTT	GTA	GTA	GCG	ATT	GTA	240
33	Y	L	Q	I	T	A	A	A	A	G	L	V	V	E	I	V	48
241	TTA	CTT	GCA	TTA	GCC	GCA	ACA	TTG	TTT	GTT	AAA	ACT	ACA	GCT	AAA	ACA	288
49	L	L	A	L	G	A	T	F	F	V	K	T	R	B	E	T	64
289	AAT	CAA	ATG	CTT	GCT	GCA	CTT	CAA	GAT	GCT	CAA	CAA	GAA	GAA	GTC	GCA	336
65	N	E	M	L	A	A	L	Q	B	A	E	B	E	E	Y	A	80
337	CAA	GAA	GAA	CAA	GCT	GAA	GAA	AAT	GTT	GAA	GTC	ACT	CCA	ACT	CAA	CAA	384
81	Q	E	E	Q	A	E	B	N	Y	E	V	T	P	T	Q	Q	96
385	GCT	GAA	GTT	AAG	ACT	GAA	CAA	TTA	ATT	GCC	ACA	CAA	TTA	GTA	ACA	ACT	432
87	A	E	V	K	T	E	Q	L	I	G	T	Q	L	V	T	T	112
438	GAT	GTA	GCT	AGC	AAT	CAA	GCT	GCA	GCT	ACT	GAA	CAA	GTT	GAA	GCT	GAT	480
113	D	V	A	S	N	Q	A	A	C	T	E	Q	V	E	C	D	128
481	TTA	TTA	GCT	GCT	AGT	CAA	CAA	CCA	ACG	GAA	ATG	GCT	CCA	GCT	GCT	TCA	528
120	L	L	P	P	S	Q	Q	P	T	E	M	R	P	A	P	S	144
529	CCA	ATG	GCT	AGT	GCT	AAT	TTA	TTA	GCT	CCA	AAC	CAA	GCT	GCT	CAT	CCA	576
145	P	M	G	S	P	K	L	L	G	P	N	Q	A	E	P	P	160
577	CAA	CAC	GGA	CCA	GCT	CCG	ATG	AAT	GCT	CAT	CCA	GCT	CAA	CCA	GCT	GCT	624
161	Q	D	G	P	R	P	M	R	A	B	P	G	Q	P	R	P	176
625	CAA	CAA	GCT	GCC	CCA	GCT	CCA	ATG	GGA	GCT	GCT	GCA	TCT	AAC	CAA	CCA	672
177	Q	Q	A	G	P	R	P	M	G	A	G	G	S	N	Q	P	192
673	AGA	CCC	ATG	GCA	AAT	GCT	CCA	CAA	AAC	CAA	CAA	GCT	CCA	AGA	CCA	ATG	720
193	R	P	M	P	R	G	P	Q	N	Q	Q	G	P	R	P	M	208
721	AAC	GCT	CAA	GCC	AAT	GCT	GCT	GCT	GGA	CCA	GCT	GCC	CCA	CCA	GCT	AAC	768
200	N	P	Q	C	N	P	R	P	G	P	A	G	P	R	P	N	224
760	GGC	CCA	CAA	AAT	TCT	CAA	CCA	GCT	GCT	CAA	CCA	GCT	GCC	CCA	GCT	CCA	816
225	G	P	Q	N	S	Q	P	R	P	Q	P	A	G	P	R	P	240
817	ATG	GCA	GCT	GCT	AGA	TCT	AAC	CAA	CCA	AGA	CCA	ATG	CCA	AAT	GCT	CCA	864
241	M	G	A	G	R	S	B	Q	P	R	P	M	P	N	G	P	256

865	CAA AAC CAA CAA GGT CCA AFA CCA ATG AAC CCT CAA GGC AAT CCT CGT	912
257	Q N Q Q G P R P M N P Q G N P R	272
913	CCT CAA CCA GCT GGT GTC AGA CCT AAC AGC CCA CAA GCT AAC CAG CCA	960
273	P Q P A C V R P M S P Q A N Q P	288
961	GGA CCA GCT CCA ACC CCA AAT AAT CCT CAA GGA CCA GGG CCA ATG GCT	1008
289	G P R P T P N H P Q G P R P M G	304
1009	CCA AFA CCA AAT GGA GGA CCA AAC CGA GCT TAA TTA ACC AAT AGA TTA	1056
305	P R P N C E P B R A G	315
1057	GCT CTA AAT TTC AAA ACA GTT CAT TTC CTA GAA AAT GAA CTG TTT TTT	1104
1105	TTA TTA TTT CTA ACT AAA TTT ATT AAT CAA CCG CTT GTT TTG TTG AAT	1152
1153	AAA GAT AGA TCA CAA CAT CTT CTT GAT TTA CAT CTT TAA TTT GCA TAT	1200
1201	TAT TCA TCA TTA AAG GGA TCT TGA TGA TCT GAT ACA TCT TGT TAT TCT	1248
1249	CAT AAT CAA GAT AAT TAA GAT GTG AAG CAC TAA AAG CAA ATA GCT CTT	1296
1297	CTT CAG ATT GGA TTA GTT CTT TAG CAT TAT TTA AGA ACG ACT GAT CAT	1344
1345	CAG TCA GTA ATA ATA AGA TCT GAT TCA ACT TTT TGA TAT CAG TTG CTA	1392
1393	CTT CTT GAT TTA ACA TCA ATG TTT CAT AGC CTC ATA ATA AGG ATT TAA	1440
1441	AAC GGT GAA TGA TTG ATG TCG TTG CAC TTT TCT CAT GGT TCG TTT CAA	1488
1489	CGT ATT GAA AAG TGT TCA TTA AGT TAA TGT ATT CTT GCT GGT ATT TCT	1536
1537	TAT TAA TCT GAT CAG GGT TAT CTG AAT AGA TTA AGA TGT TCT TAT TAG	1584
1585	TTT GAT CAA CAA TAA CCA TCG TTG CTT TCA TTA AAG CTC AGT AAG TAA	1632
1633	ATA GTT TTT CAA TCT TAT GCT TTA ATA AAA ACG GGA TGA TAT TCT TAT	1680
1681	GTA GGT TAA ACT TAT TAA AAA TAA GTT TTG CAA TCT GGT TGA CTA GTT	1728
1729	TAT GAT CAA CCT GCT TGA TAG TTA ATT TCT TAA GCA TAA GAA CAT TTT	1776
1777	AAA ATA TTT AAA AAA ACT ATT GCT GAT ATG TTA AAA TAG TTA AGG TAT	1824
1825	AAA AAT AAT AAA TTA AAT ATG GCT CGT AGA GAT GAT CTA ACC GCG CTT	1872
1873	GGT CCT TTA GCA GGA AAT AAT CGT TCT CAT GCT TTA AAC ATT ACC AAG	1920
1921	GCT CCT TGA AAC TTA AAC CTA CAA A	1945

【0044】

【配列2】

配列番号：2

配列の長さ：48

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AATTCGAGCT CGGATCCTTG AAAAAATAAT ATAGATCCTA AAATGGAA

48

【0045】

【配列3】

配列番号 : 3  
配列の長さ : 48  
配列の型 : 核酸  
鎖の数 : 1本鎖  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA  
配列

GATCTTCCAT TTTAGGATCT ATATTATTTT TTCAACGATC CGAGCTCG

48

【0046】

【配列4】

配列番号 : 4  
配列の長さ : 55  
配列の型 : 核酸  
鎖の数 : 1本鎖  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA  
配列

AGCTTTTTT TTTTTTTTTT TTGGCATAT AAATAATAAA TACAATAATT AATTA 55

【0047】

【配列5】

配列番号 : 5  
配列の長さ : 55  
配列の型 : 核酸  
鎖の数 : 1本鎖  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA  
配列

CGCGTAATTA ATTATTGTAT TTATTATTIA TATGCCAAAA AAAAAAAAAA AAAAA 55

【0048】

【配列6】

配列番号 : 6  
配列の長さ : 40  
配列の型 : 核酸  
鎖の数 : 1本鎖  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA  
配列

CGCGTAAAAA TTGAAAAACT ATTCTAATTT ATTGCACTCG

40

【0049】

【配列7】

配列番号：7

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATCCGAGTG CAATAAATTA GAATAGTTTT TCAATTTTTA

40

【0050】

【配列8】

配列番号：8

配列の長さ：42

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATCCCCGGG CGAGCTCGCT AGCGGGCCCG CATGGGTAC CG

42

【0051】

【配列9】

配列番号：9

配列の長さ：42

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCGACGGATC CGCATGCGG CCCGCTAGCG AGCTCGCCCG GG

42

【0052】

【配列10】

配列番号：10

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCGACCCGGT ACATTTTAT AAAAATGTAC CCGGGGATC

39

【0053】

【配列11】

配列番号：1 1  
配列の長さ：3 5  
配列の型：核酸  
鎖の数：1 本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成DNA  
配列

【0054】  
【配列12】

GATCCCCGGG TACATTTTGA TAAAAATGTA CCGGG

35

配列番号：1 2  
配列の長さ：1 4  
配列の型：核酸  
鎖の数：1 本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成DNA  
配列

【0055】  
【配列13】

ATTTTATAA AAAT

14

配列番号：1 3  
配列の長さ：1 3 8 7  
配列の型：核酸  
鎖の数：2 本鎖

トボロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

AAAAACATCA GATTGTTTAT CTGATATCTT TGCTTAAAA AACACAAAAT CTCTACCAA	60
AATGCTAAAT AAATAAGCCG TTAAATTAC TAAGAAATA AAAAATGCT TTTCTATC	120
AAACAAAAT CTCTAGTAAT AAAGCCTAT TATTTTAT TTTTACTCAT CTTTANGAT	180
ATAATATAT CTAAATATC T ATG AAT AAG AAA AGA ATC ATC TTA AAG ACT Met Asn Lys Lys Arg Ile Ile Leu Lys Thr 1 5 10	231
ATT AGT TTC TTA GGT ACA ACA TCC TTT CTT AGC ATT GGG ATT TCT AGC Ile Ser Leu Leu Gly Thr Thr Ser Phe Leu Ser Ile Gly Ile Ser Ser 15 20 25	279
TGT ATG TCT ATT ACT AAA AAA GAC GCA AAG CCA AAT AAT GCG CAA ACC Cys Met Ser Ile Thr Lys Lys Asp Ala Asn Pro Asn Asn Gly Gln Thr 30 35 40	327
CAA TTA CAA GCA GCG CGA ATG GAG TTA ACT GAT CTA ATC AAT GCT AAA Gln Leu Gln Ala Ala Arg Met Glu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Ala Lys 45 50 55	375
CCA AGC ACA TTA GCT TCA CTA CAA GAC TAT GCT AAG ATT GAA GCT AGT Ala Arg Thr Leu Ala Ser Leu Gln Asp Tyr Ala Lys Ile Glu Ala Ser 60 65 70	423
TTA TCA TCT GCT TAT AGT GAA GCT GAA ACA GTT AAC AAT AAC CTT AAT Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Glu Ala Glu Thr Val Asn Asn Asn Leu Asn 75 80 85 90	471
GCA ACA CTA GAA CAA CTA AAA ATG GCT AAA ACT AAT TTA GAA TCA GCC Ala Thr Leu Glu Glu Leu Lys Met Ala Lys Thr Asn Leu Glu Ser Ala 95 100 105	519
ATC AAC CAA GCT AAT AGC GAT AAA AGC ACT TTT GAT AAT CAA CAT CCA Ile Asn Gln Ala Asn Thr Asp Lys Thr Thr Phe Asp Asn Glu His Pro 110 115 120	567
AAT TTA GTT CAA CCA TAC AAA CCA CTA AAA ACC ACT TTA GAA CAA CGT Asn Leu Val Glu Ala Tyr Lys Ala Leu Lys Thr Thr Leu Glu Gln Arg 125 130 135	615
GCT ACT AAC CTT GAA GGT TTA GCT TCA ACT GCT TAT AAT CAG ATT CGT Ala Thr Asn Leu Glu Gly Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Ile Arg 140 145 150	663
AAT AAT TTA GTC GAT CTA TAC AAT AAT GCT AGT AGT TTA ATA ACT AAA Asn Asn Leu Val Asp Leu Tyr Asn Asn Ala Ser Ser Leu Ile Thr Lys 155 160 165 170	711
ACA CTA GAT CCA CTA AAT GGG GGA ATG CTT TTA GAT TCT AAT GAC ATT Thr Leu Asp Pro Leu Asn Gly Gly Met Leu Leu Asp Ser Asn Glu Ile 175 180 185	759
ACT ACA GTT AAT CCG AAT ATT AAT AAT ACG TTA TCA ACT ATT AAT GAA Thr Thr Val Asn Arg Asn Ile Asn Asn Thr Leu Ser Thr Ile Asn Glu 190 195 200	807

CAG AAG ACT AAT GCT GAT GCA TTA TCT AAT AGT TTT ATT AAA AAA CTG Gln Lys Thr Asn Ala Asp Leu Ser Asn Ser Phe Ile Lys Lys Val 205 210 215	855
ATT CAA AAT AAT GAA CAA AGT TTT GTA CCC ACT TTT ACA AAC CCT AAT Ile Gln Asn Asn Glu Gln Ser Phe Val Gly Thr Phe Thr Asn Ala Asn 220 225 230	903
GTT CAA CCT TCA AAC TAC AGT TTT GTT GCT TTT AGT GCT GAT GTA ACA Val Gln Pro Ser Asn Tyr Ser Phe Val Ala Phe Ser Ala Asp Val Thr 235 240 245 250	951
CCC GTC AAT TAT AAA TAT GCA AGA AGC ACC GTT NNN AAT GGT GAT GAA Pro Val Asn Tyr Lys Tyr Ala Arg Arg Thr Val Xaa Asn Gly Asp Glu 255 260 265	999
CCT TCA AGT ACA ATT CTT CCA AAC ACC AAT AGT ATC ACA GAT GTT TCT Pro Ser Ser Arg Ile Leu Ala Asn Thr Asn Ser Ile Thr Asp Val Ser 270 275 280	1047
NNN ATT TAT AGT TTA GCT GGA ACA AAC ACG AAG TAC CAA TTT AGT TTT Xaa Ile Tyr Ser Leu Ala Gly Thr Asn Thr Lys Tyr Gln Phe Ser Phe 285 290 295	1095
AGC AAC TAT GGT CCA TCA ACT GGT TAT TTA TAT TTC CCT TAT AAG TTG Ser Asn Tyr Gly Pro Ser Thr Gly Tyr Leu Tyr Phe Pro Tyr Lys Leu 300 305 310	1143
GTT AAA CCA CCT GAT GCT AAT AAC GTT CCA TTA CAA TAC AAA TTA AAT Val Lys Ala Ala Asp Ala Asn Asn Val Gly Leu Gln Tyr Lys Leu Asn 315 320 325 330	1191
AAT GGA AAT GTT CAA CAA GTT GAG TTT GCC ACT TCA ACT AGT GCA AAT Asn Gly Asn Val Gln Gln Val Glu Phe Ala Thr Ser Thr Ser Ala Asn 335 340 345	1239
AAT ACT ACA GCT AAT CCA ACT CAG CAG TTG ATG AGA TTA AAG TTG CTA Asn Thr Thr Ala Asn Pro Thr Gln Gln Leu Met Arg Leu Lys Leu Leu 350 355 360	1287
AAA TCG TTT TAT CAG GTT TAAGATTTCG CCACACACCA ATCGAATTAA Lys Ser Phe Tyr Gln Val *	1335
365	

GTCITCCAC GGGTGAGGA AATATGATA AAGTTGGCC AATGATTGGC AA --Bgl II 1387

【図面の簡単な説明】

- 【図1】 TM-16ポリペプチド全長をコードするDNAの制限酵素切断点地図。  
【図2】 TTM-1ポリペプチド全長をコードするDNAの制限酵素切断点地図。

【図3】 TTM-1N及びTTM-1Cの作製方法。

【図4】 TM-16ポリペプチドをコードするDNA近傍のオープンリーディングフレーム制限酵素切断点地図。

【図5】 pMUTABの作製方法。

【図6】 pAcZM1の作製方法。

【手続補正書】

【提出日】平成6年6月2日

【手続補正1】

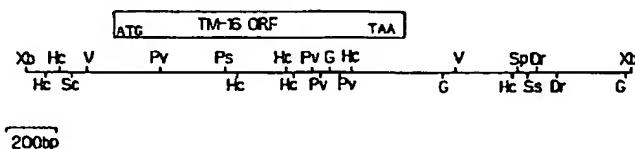
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正内容】

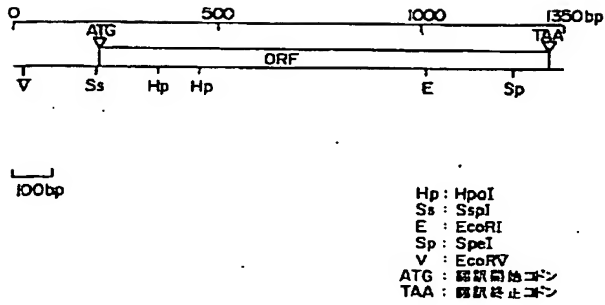
【図1】



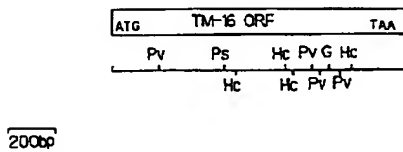
Hc:Hinc II.Pv:Pvu II.Ps:Pst I.G:Bgl II



【図 2】

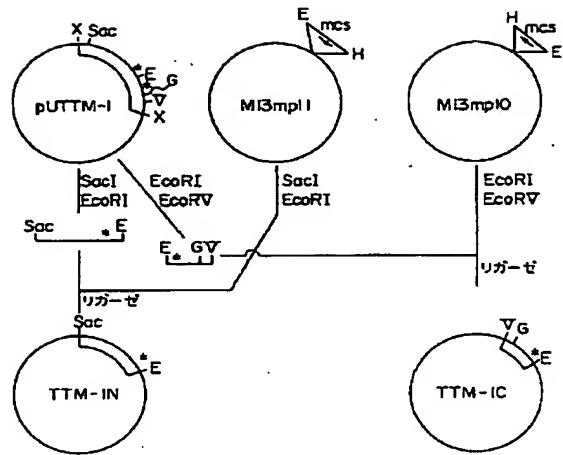


【図 4】



Xb:Xba I, Hc:Hinc II, Sc:Sca I, V:EcoR V, Pv:Pvu II  
Ps:Pst I, G:Bgl II, Sp:Spe I, Dr:Dra I, H:Hind III

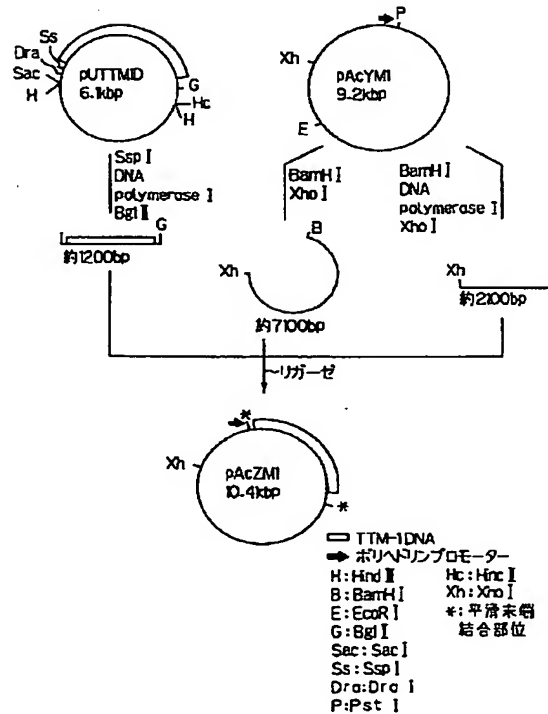
【図 3】



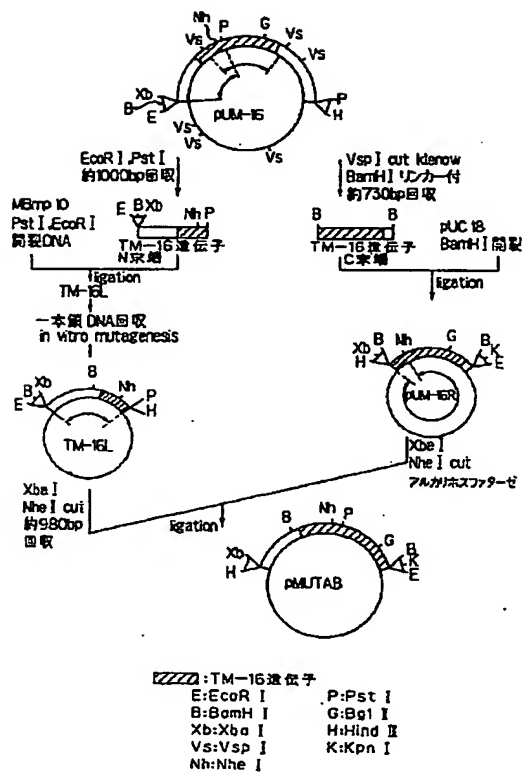
E: EcoRI  
V: EcoRV  
G: Bgl II  
Sac: SacI  
X: XbaI  
Ss: SspI  
Sp: SpeI

\* 変異をかけるヌクレオチドの位置

【図 6】



【图5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

C 1 2 P 21/02

//(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:92)

識別記号 庁内整理番号

C 9282-4 B

FI

### 技術表示箇所

(72) 発明者 船戸 洋乃

埼玉県草加市吉町3-3-7

(72) 発明者 青山 茂美

滋賀県甲賀郡水口町貴生川370-13

(72)発明者 入谷 好一

京都府京都市伏見区深草大亀谷万帖敷町  
151番地

(72) 発明者 高橋 清人

滋賀県栗太郡栗東町小平井71-21